

T.C.
CUMHURİYET ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ
TIBBİ BİYOLOJİ ANABİLİM DALI

**PRE-EKLAMPSİ, EKLAMPSİ VE HELLP
SENDROMU RİSKİ VE İNSAN
MİKROZOMAL EPOKSİD HİDROLAZ
GENİ EKZON-4 POLİMORFİZMİNİN
ARAŞTIRILMASI**

**YÜKSEK LİSANS TEZİ
Meral YILMAZ**

**Danışman Öğretim Üyesi
Doç. Dr. Ergün PINARBAŞI**

**2005
SİVAS**

Bu tez Cumhuriyet Üniversitesi Senatosunun 05. 01. 1984 tarih ve 84/1 nolu kararı ile kabul edilen tez yazma yönergesine göre hazırlanmıştır.

İÇİNDEKİLER

TEŞEKKÜR	IV
ŞEKİLLER DİZİNİ	V
TABLO ve RESİM DİZİNİ	VI
1. GİRİŞ	1
2. GENEL BİLGİLER	4
2.1. Pre-eklampsi, eklampsi ve HELLP sendromu	4
2.2. Pre-eklampsi, eklampsi ve HELLP sendromunun tarihsel özgeçmişi	5
2.3. Pre-eklampsi, eklampsi ve HELLP sendromunun insidansı ve risk faktörleri	6
2.4. Etiyolojisi ve ileri sürülen teoriler	7
2.5. Pre-eklampsi, eklampsi ve HELLP sendromu ile ilgili aday gen çalışmaları	9
2.6. Biyotransformasyon enzimleri ve detoksifikasyon mekanizmaları	15
2.6.1. Mikrozomal epoksid hidrolaz enzimi ve detoksifikasyon mekanizması	21
2.6.2. Mikrozomal epoksid hidrolaz enzim (mEH) polimorfizmleri ve pre-eklampsi, eklampsi, HELLP sendromu ile ilişkisi	22
2.6.3. Mikrozomal epoksid hidrolaz enzim polimorfizmleri ve diğer hastalıklarla ilişkisi	23
2.7. Polimorfizmin tanımı ve genetik polimorfizmlerin tanımlanmasında kullanılan yöntemler	28
2.7.1. Polimorfizm çalışmalarında kullanılan PCR (Polymerase Chain Reaction) yöntemi	29
2.7.2. Polimorfizm çalışmalarında kullanılan RFLP (Restriction Fragment Length Polymorphism) yöntemi	32

3. GEREÇ ve YÖNTEM	34
3.1.1. Kullanılan cihazlar	34
3.1.2. Kimyasal maddeler	35
3.2. Çalışma Grubu	36
3.3. Örneklerin alınması	36
3.4. DNA izolasyonu	37
3.5. Genotipleme	38
3.6. Jel elektroforezi	40
3.6.1. Jelin hazırlanması	40
3.6.2. Jelde DNA'nın koşturulması	40
4. İSTATİSTİKSEL ANALİZ	41
5. BULGULAR	42
6. TARTIŞMA ve SONUÇ	48
7. ÖZET	53
8. SUMMARY	55
9. KAYNAKLAR	57
EKLER	69
YEREL ETİK KURUL KARARI	73

TEŞEKKÜR

Her zaman bilgi birikiminden yararlandığım, bilimsel düşünme yetisi kazanmamı sağlayan, öğrencisi olmanın ayrıcalıklı olduğunu hissettiğim danışmanım Doç. Dr. Ergün Pınarbaşı'na çalışmalarında gösterdiği sabır ve katkılarından dolayı teşekkür ederim.

Çalışmalarında verdiği desteği tüm yaşamım boyunca hissedeceğim Prof. Dr. E. Ferda Perçin'e ve desteklerini benden esirgemeyen Tıbbi Biyoloji A.D. öğretim elemanlarından Prof. Dr. Ahmet ÇOLAK ve Yrd. Doç. Dr. İzzet YELKOVAN' a teşekkür ederim.

Ayrıca çalışmamda verdikleri katkı ve desteklerden dolayı Prof .Dr. Ali Çetin, Doç. Dr. Meral Çetin, Yrd. Doç. Dr. Hafize Sezer, Yrd. Doç. Dr. Hatice Pınarbaşı ve Genetik A.D. tüm öğretim elemanları ve çalışanlarına teşekkür ederim.

Birlikte çalışmaktan mutlu olduğum doktora öğrencisi arkadaşım Veteriner Hekim Egemen Akgün' e yanımda olduğu için teşekkür ederim.

Maneviyatını her zaman hissettiğim ve zamansız kaybettiğim ağabeyim İsmail Hakkı Yılmaz'a zorlukları başarabileceğime benden çok inandığı için, sevgili ablam Neriman Yılmaz'a yüreğimin yanında atan bir yürek daha olduğunu hissettirdiği ve yaptığı tüm fedakarlıklar için, kardeşlerim Mustafa Kemal Yılmaz ve Nermin Yılmaz'a bana inandıkları ve yanımda oldukları için, sıkıntılarımı paylaşan ve varolmamı sağlayan sevgili anne- babama sonsuz teşekkürler.

ŞEKİLLER DİZİNİ

- | | | |
|--------------------|--|----|
| Şekil 2. 1. | Biyotransformasyon enzimlerinin faz I ve faz II Reaksiyonlarının basitleştirilmiş şeması | 17 |
| Şekil 2. 2. | Biyotransformasyon enzimlerinde meydana gelen polimorfizmin farklı moleküler mekanizması | 18 |
| Şekil 2. 3. | Vücut için zararlı bileşenler olan epoksidlere bir molekül suyun eklenmesi ile daha zararsız dihidrodiol ürününün oluşması | 21 |
| Şekil 2. 4. | PCR (Polymerase Chain Reaction) | 31 |
| Şekil 5. 1. | Hasta gruplarının DNA'larından PCR yöntemi ile amplifiye edilen EPHX geninin ekson-4 bölgesi ve RFLP yöntemi sonrasında oluşan fragmentlerin agaroz jel üzerinde gösterilmesi. | 47 |

TABLO VE RESİM DİZİNİ

Tablo 3. 5. 1. PCR koşulları	38
Tablo 3. 5. 2. PCR programı	39
Tablo 3. 5. 3. RFLP koşulları	39
Tablo 5. 1. Hasta ve kontrol grubunda yer alan bireylerin demografik ve klinik özellikleri	42
Tablo 5.2. EPHX geninin ekson-4 bölgesinde polimorfik allel dağılımı	45
Tablo 5.3. Hastalığın ortaya çıkmasında hasta gruplarının kontrol grubuna göre taşıdığı risk oranları	46

1. GİRİŞ ve AMAÇ

Poli ve morfizmos kelimelerinden oluşan ve eski Yunanca'da “*çok şekillilik*” anlamı taşıyan polimorfizm, türlerin buldukları ortama adaptasyonlarını kolaylaştırarak, evrimsel süreçte ayakta kalabilmelerine olanak sağlamasının yanı sıra tıp alanında yapılan polimorfizm çalışmalarında elde edilen bulgular, hastalıklara yatkınlığın belirlenmesinde ve tedavinin yönlendirilmesinde önem taşımaktadır.

Polimorfizm ve hastalıklar arasındaki ilişkisinin araştırıldığı çalışmalar arasında pre-eklampsi, eklampsi ve HELLP sendromunda yer almaktadır.

Anne ve bebek ölüm nedenlerinin ilk sıralarında yer alan pre-eklampsi, eklampsi ve HELLP sendromu gebeliğin 20. haftasından sonra proteinüri ile birlikte hipertansiyonun ve yaygın ödemin gelişmesi olarak tanımlanan gebeliğe özgü sendromlardır (1). Etiyolojileri hakkında çeşitli varsayımlar ileri sürülmesine karşın günümüze kadar net bir açıklama getirilememiştir (2, 3).

Lipid peroksidlerin ve serbest oksijen radikalleri ile detoksifiye edici enzimler (biyotransformasyon enzimleri) arasındaki dengenin bozulmasına bağlı gelişen endotel hücre hasarının, sendromların fizyopatolojisinde etkin olduğu düşünülmektedir (4, 5). Son yıllarda, oksidasyon-detoksifikasyon dengesinde meydana gelen aksaklıkların nedeni olarak, biyotransformasyon enzimlerini kodlayan genlerde meydana gelen polimorfizmler gösterilmektedir (6).

Zenobiyotik metabolizmasında rol oynayan enzimleri (biyotransformasyon enzimleri) kodlayan genlerde, bireyler arasındaki etnik farklılıklara, yaşam şekli ve çevresel faktörlere bağlı olarak, değişik polimorfik formlar oluşabilmekte ve bunların sıklıklarında da farklılıklar meydana gelmektedir. Genotipte meydana gelen değişiklikler fenotipe yansıyabilmekte ve enzim aktivitesinde değişikliğe neden olabilmektedir. Tüm çevresel faktörlerin yanı sıra, biyotransformasyon enzimlerindeki genetik polimorfizm, bireyler arasındaki enzim aktivitesinde görülen farklılığın ana kaynağıdır (6, 7).

Biyotransformasyon enzimlerinden epoksid hidrolaz enzim grubu (mikrozomal, çözümlenebilir kolesterol, hepoksilin A₃ hidrolaz ve lokotrin A₄ hidrolaz şeklinde sıralanır), çeşitli kimyasal reaksiyonları katalizleyerek, detoksifikasyon mekanizmalarının farklı basamaklarında işlev yapmaktadırlar. Bu grup arasında yer alan mikrozomal epoksid hidrolaz (mEH), zararlı epoksidlere bir molekül su bağlayarak onları daha zararsız dihidrodiol ürünlerine dönüştürür (8, 9).

mEH enzim aktivitesi bireyler arası farklılık göstermektedir. Bu farklılığın nedeni enzimi kodlayan gende görülen polimorfizmlerdir. Polimorfizmlere bağlı bazı hastalıklara karşı yatkınlık oluşturabileceği düşüncesi ile birçok çalışma yapılmıştır (Akciğer, kolorektal, meme, farenks, larenks, özefagus, over, hepatosellüler karsinoma gibi kanser çeşitleri, miyokardial infarktüs, anfiyem ve kronik obstrüktif pulmoner hastalığı (COPD), hiperkolonemia). Bu çalışmaların bazılarının hastalıkla ilişkisi tespit edilirken bazıları ile anlamlı bir ilişki bulunamamıştır (7).

Ayrıca son yıllarda yapılan çalışmalarda, enzim aktivitesinde meydana gelen değişikliklerin pre-eklampsi benzeri hastalıklara bireysel yatkınlığı artırdığı da düşünülmektedir.

Hollanda popülasyonunda yapılan bir çalışmada, pre-eklampsi ve HELLP sendromu tanısı konmuş hastalarda EPHX geni ekzon-3 ve ekzon-4 polimorfizmleri incelenmiştir.

EPHX geninin 3. ekzonunda Timinin (T) yerini Sitozinin (C) almasıyla (113. kodonda Tirozin (Tyr) Histidine (His) dönüşmesiyle) oluşan polimorfizmin enzim aktivitesini %40 azalttığı tespit edilmiştir. Bu incelemeye dayanarak 113His alleli *yavaş allel* olarak adlandırılmıştır.

Genin 4. ekzonunda Adenin yerini Guaninin alması ile 139. kodonda Histidin amino asidinin Arjinine (Arg) dönüşmesiyle meydana gelen polimorfizm, enzim aktivitesini yaklaşık olarak %25 artırdığı gözlemlenmiştir. Buna bağlı olarak 139 Arg alleli *hızlı allel* olarak adlandırılmıştır. Çalışma sonucunda, kontrol grubu ile karşılaştırılan pre-eklampsi/HELLP sendromlu hasta grubunda 113Tyr/113Tyr homozigot oranının daha yüksek olduğu bulunurken,

139His→139Arg polimorfizm dağılımı açısından gruplar arasında bir fark bulunamamıştır.

Bu bulgulardan yola çıkarak endojen veya ekzojen toksik bileşiklerin metabolik aktivasyonunda farklılıklara neden olan 3. ekzonda hızlı aktivite genotipinin pre-eklampsie yatkınlığı artırabileceği ifade edilmiştir. Bununla birlikte EPHX geninde meydana gelen bu polimorfizmlerin pre-eklampsinin yanı sıra HELLP sendromu gelişiminde risk oluşturmadıkları bildirilmiştir (10).

Benzer bir çalışma Finlandiya populasyonunda yapılmış, çalışma sonucunda, Timin-Adenin (113Tyr ve 139Arg) haplotip sıklıklarının pre-eklampsie ile anlamlı bir birliktelik gösterdiği tespit edilmiştir. Ayrıca Hollandalı pre-eklampsi hastalarda yapılan çalışmada, bu belirli haplotiplerin pre-eklampsie gelişiminde risk artışına neden olabileceği belirtilmiştir (11).

Çalışmamız, insan mikrozomal epoksid hidrolaz enzimini kodlayan EPHX geninin ekzon-4 bölgesindeki 139His→139Arg polimorfizminin, yüksek oranda maternal mortalite ve morbiditeye neden olan, son yıllarda genetiksel bir temelini olduğu düşünülen pre-eklampsie, eklampsie ve HELLP sendromunun gelişmesinde bir risk faktörü olup olmadığını araştırmak amacıyla yapılmıştır.

2. GENEL BİLGİLER

2. 1. Pre-eklampsi, Eklampsi ve HELLP Sendromu

Son zamanlarda genetik bir temelini olduğuna inanılan pre-eklampsi, eklampsi ve HELLP sendromu gebeliğin 20. haftasından sonra proteinüri ile birlikte hipertansiyonun ve yaygın ödemin gelişmesi olarak tanımlanan gebeliğe özgü sendromlardır (1).

Pre-eklampside tanı kriterleri; gebeliğin 20. haftasından sonra görülen hipertansiyon (6 saat aralıklarla yapılan ölçümlerde, sistolik kan basıncının 140mmHg'nin, diastolik kan basıncının 90mmHg'nin üzerinde olması veya gebelik öncesi sistolik kan basıncının 30mmHg, diastolik kan basıncının 15mmHg'nin üzerinde yükselme göstermesi), proteinüri (24 saatlik idrarda 300mg'ın üzerinde protein bulunması veya en az altı saat arayla alınan iki rastlantısal idrar örneğinde idrar protein konsantrasyonunun en az 1g/L olması) ve ödem (su tutulumu) ile karakterizedir (12).

Ağır pre-eklampside ise, 6 saat arayla iki ayrı ölçümde kan basıncı 160/110 mmHg' den yüksektir. Ayrıca 24 saatlik idrarda proteinüri 5 g'dan fazladır. Karaciğer enzimlerinde yükselme, trombosit miktarının düşmesi (trombositopeni), 24 saatlik idrarın 500ml'den az olması (oligoüri), serebral veya görme ile ilgili rahatsızlıklar, akciğer ödemi veya siyanoz, epigastrik veya karnın sağ üst bölgesinde ağrı ve fetal büyüme geriliği gözlenebilmektedir (13).

Eklampsi; şiddetli pre-eklampsi bulgularına şuur kaybı, tonik-klonik kasılmalar ve kanamanın eklenmesiyle ortaya çıkan klinik bir tablodur. Bu tablo gebelikte nörolojik bir hasar olmadan gelişen konvülsiyon ve/veya koma durumu olarak da ifade edilebilir. Baş ağrısı, görme bozukluğu, sağ üst karın bölgesinde meydana gelen ağrı eklampitik nöbetlerin gelişmesi öncesinde görülen alarm işaretleridir (14).

HELLP;

- **Hemolysis** = Anormal kanama (periferik kan yaymasında anormal eritrositler görülmesi, total bilirubin düzeyinin 1.2mg/dl, laktat dehidrogenaz düzeyinin 600 IU/L olması, ilerleyici anemi bulgularının olması),
- **Elevated Liver Enzymes** = Karaciğer enzimlerinin yükselmesi (AST = serum aspartat aminotransferaz ve ALT = serum alanin aminotransferaz 40 IU/L olması),
- **Low Platelets Count** = Trombositopeni (trombosit miktarının $150.000/mm^3$ olması) bulgularının baş harflerinin birleştirilmesiyle oluşturulmuş bir kombinasyondur (15, 16).

2. 2. Pre-eklampsi, Eklampsi ve HELLP sendromu ‘nun tarihsel özgeçmişi

18. ve 19. yüzyılın sonlarına kadar kan basıncı ölçüm tekniğinin geliştirilememesi ve proteinürinin saptanamaması, hastalığın nöbet ve koma durumu oluşuncaya kadar tespit edilememesine ve buna bağlı olarak, eklampsi sendromunun pre-eklampside daha eski bir tarihte tanınmasına neden olmuştur. Eklampsi ile ilgili ilk kayıt, 3000 yıl önce Mısır’da Kolun Papirüsleri’nde bulunmuştur. Hipokrat zamanından beri korkulan bir komplikasyon olmuştur. Hipokrat, gebe kadınlarda uyuşukluk, koma ve nöbet şeklinde ciddi bulgular bildirmiştir. Varandaeus 1619 yılında, gebe kadınların nöbet öncesi parlayan ışıklardan sık sık söz etmesinden dolayı ilk kez orijinali yunanca bir terim olan “eklampsi” adını kullanmıştır (17).

Pre-eklampsi ile ilgili bilgiler 1843 yılında Lewer tarafından netlik kazanmıştır. Lewer pre-eklampsinin, albuminuria, hipertansiyon ve bazen aşırı ödemin görüldüğü ve nöbetlerin meydana gelmesinden önceki önemli zamanı anlatan sendrom olarak tanımlandığını rapor etmiştir (18).

Uzun yıllar ağır pre-eklampsi bulguları olarak değerlendirilen, damar içi kanama, karaciğer fonksiyon bozukluğu, pıhtılaşma bozuklukları ve trombositopeni bulgularının (trombosit miktarının düşmesi) ağır pre-eklampsi/eklampsiden bağımsız olarak meydana gelen bir semptom olduğunu ileri sürülmüş ve oluşan bu sendromu “HELLP sendromu (**H**emoliz, **E**levated **L**iver **E**nzymes, **L**ow **P**latelet count)” olarak adlandırılmıştır (19).

2. 3. Pre-eklampsi, eklampsi ve HELLP sendromu insidansı ve risk faktörleri

Pre-eklampsi insidansının, coğrafik ve ırksal farklılıklara göre değişiklik gösterdiğine dair ifadeler vardır. Buna rağmen tüm gebelikler içinde %6-8 oranında izlenmektedir. Sendromun ilk gebelikte görülme oranı ise %85'tir. İleri yaşlarda daha çok gebeliğin tetiklediği hipertansiyon şeklinde kendini göstermektedir (12).

Eklampsi insidansı ise doğum öncesi dönemde %60 oranındadır. Ayrıca tüm doğumların %0.2-0.5'inde görülmektedir. HELLP sendromunun görülme sıklığı ise %03-0.8 oranındadır. Pre-eklampsi ile birlikte veya proteinüri ve hipertansiyon bulguları olmadan da %20 oranında izlenmektedir. Bu üç klinik tablonun ortaya çıkmasında birçok faktör rol oynadığı için pre-eklampsi, eklampsi ve HELLP sendromu, multifaktöriyel hastalıklar olarak değerlendirilmektedir (13).

Pre-eklampsi oluşumunda, obstetrik (doğumla ilgili) ve non-obstetrik (doğumla ilgili olmayan) risk faktörleri önem taşımaktadır.

Obstetrik risk faktörleri:

Primigravidite (ilk gebelik), yeni eş, önceki gebeliklerde pre-eklampsi öyküsü olması, pre-eklampsi, eklampsi veya HELLP sendromu aile öyküsü, çoğul gebelik, mol hidatiform, fetal hidrops, trizomi- 13 vb.

Obstetrik olmayan risk faktörleri ise:

Obesite, böbrek ve damar hastalıkları, esansiyel hipertansiyon, diabetes mellitus, otoimmün hastalıklar (sistemik lupus eritematozus ve antifosfolipid sendromu), trombofilik durumlar, 35 veya üzeri yada daha küçük yaşlar, siyahi ırk(Afrikalı veya Amerikan ırk) (20).

2. 4. Etiyolojisi ve ileri sürülen teoriler

Pre-eklampsinin etiyojisini açıklamaya yönelik çalışmalar büyük bir karmaşa yaratmıştır. Bu karmaşayı anlatmak amacıyla da yıllarca pre-eklampsi “*teorilerin hastalığı*“ olarak adlandırılmıştır. 1900’lerin başında yer alan bu tanım, üçüncü milenyuma girdiğimiz şu günlerde de hala geçerliliğini korumaktadır. Bu konuda ileri sürülen bazı teoriler şunlardır; anormal trofoblast invazyonu, damar endotel hasarı, pıhtılaşma anormalliği, kalp-damar maladaptasyonu, immünolojik fenomen, diyetle bulunan bazı elemanların eksikliği veya fazlalığı, oksidatif stres ve genetik yatkınlıktır. İleri sürülen bu mekanizmalardan bir veya birkaçının bir arada olması pre-eklampsinin fizyopatolojik semptomlarının oluşmasını sağlamaktadır (2, 3).

Birkaç yıl önce, pre-eklampsinin fizyopatolojisini çok yönlü açıklayabilecek bir hipotez geliştirilmiş, yapılan diğer çalışmalarla da bu hipotez desteklenmiştir. Buna göre pre-eklampsi; plasentanın anormal trofoblast invazyonu sonucunda plasental perfüzyonun zayıflamasıyla meydana gelmektedir (4).

Normal insan gebeliğinde trofoblast, uterusun içine kadar (birinci trimesterde desidual segmente kadar, ikinci trimesterde myometrial segmente kadar) baştan başa invaze olarak yayılmaktadır. Maternal spiral arterler fetüse besin ve oksijen sağlamak için yüksek dirençli damar kapasitesinden düşük dirençli damar kapasitesine değişmektedir. Pre-eklampside yüksek dirençli uterus spiral arterlerinde, yüzeysel veya yetersiz trofoblast invazyonu meydana gelmektedir. Bu da plasental yatağın perfüzyonunun yetersiz olmasına, fetüse

sağlanan oksijen ve besin miktarında azalmaya neden olmaktadır. Birinci ve ikinci trimestırda gözlenen plesantanın iskemisine bağlı olarak oksidant-antioksidant madde dengesizliği oluşmakta ve sonuçta bazı toksik maddelerin (serbest oksijen radikalleri, lipid peroksidleri vb.) ortaya çıktığı varsayılmaktadır. Bu maddeler dolaşıma katılarak endotel hücre hasarına ve aktivite değişikliğine neden olmaktadır. Kan damarlarının basınç yapıcı ajanlara ve damar geçirgenliğine karşı hassasiyeti artmakta, büyük organlara giden kan akımı azalmakta ve birçok sistemi ilgilendiren bozukluklar ortaya çıkmaktadır. Ayrıca endotel hücre hasarının pıhtılaşma bozukluklarına da neden olduğu ifade edilmektedir (4).

Meydana gelen bu fizyopatolojik değişikliklerde çevresel etmenlerinde katkısının olabileceğine dair Chesley ve Davies (1971) tarafından dikkat çekici açıklamalar yapılmıştır (5, 21).

Bazı araştırmalar ise, pre-eklampsinin patolojisinde immünolojik teoriler üzerine dikkati çekmektedir. Yeni bir eş aracılığıyla hamile kalan, suni dölleme yaptıran yada oosit bağışı alan, kollejen-damar hastalığı olan kadınlarda ve ilk gebelikte hastalığın daha sık görülmesi bu yöndeki teorileri desteklemektedir (21).

Bir yüzyıldan daha fazla süreden beri, pre-eklampsi ve eklampsiye yönelik yapılan tüm araştırmalarda üzerinde durulan diğer bir nokta da; hastalığa eğilimde genetiğin yol gösterici olabileceğidir (22).

Yapılan aile çalışmaları pre-eklampside genetik faktörlerin rol oynadığını göstermektedir. Bu konuda dikkat çekici isimlerden biri Elliot Lara'dır. Lara, beşinci gebeliğinde eklampsiden ölen bir kadının, sahip olduğu dört kızından üçünün de yine eklampsiden öldüğünü bildirmiş ve ilk kez eklampsinin ailesel insidansını rapor etmiştir. Daha sonraları araştırma tekniklerinin geliştirilmesiyle, 1960 yılında anne-kız çiftlerini çalışan Humphries tarafından pre-eklampsi ile ilgili ilk sistematik çalışma yapılabilmıştır (17).

Bundan sonra yapılan sistematik çalışmalarla pre-eklampsinin kalıtım modelleri tayin edilmeye çalışılmış, alternatif gen modelleri olarak, mitokondrial kalıtım ve genetik imprinting düşünülmüştür (24).

2. 5. Pre-eklampsi, eklampsi ve HELLP sendromu ile ilgili aday gen çalışmaları

Yapılan aday gen çalışmaları, pre-eklampsiye yatkınlık genlerinin farklı olduğunu göstermiştir. Bu çalışmaların birçoğu hasta ve kontrol grubu çerçevesi içerisinde yapılmış, ayrıca anneye ait yatkınlık genlerinin mutasyon ve polimorfizm yönünden araştırılması esasına dayandırılmıştır. Bunun sonucunda, çalışmalardan bazıları anlamlı bulunurken, bazılarında anlamlı bir sonuç elde edilememiştir. Geniş çapta yapılan birbirinden farklı ilk genom taraması 1992 yılında Hayward tarafından İskoçya'da yapılmıştır. Hayward bu çalışmanın sonucunda pre-eklampsinin gelişmesinde aday genlerin 1, 3, 9 ve 18 nolu kromozomlar üzerine lokalize olduğunu gösteren bir harita çizmiştir (25).

İkinci genom taraması, Avustralya popülasyonunda Harrison (1997) tarafından yapılmıştır. Harrison, 4q kromozomu üzerinde pre-eklampsi için aday bir bölgenin varlığını ileri sürmüştür. Arngrimsson (1999) İzlanda popülasyonunda, 2p12 üzerinde yer alan D2S286 ve 2q23 üzerinde yer alan D2S321 lokuslarının hastalıkla ilişkili olabileceğini ileri sürmüştür. Yine 2000 yılında Moses benzer kriterleri kullanılarak, Avustralya ve Yeni Zelanda popülasyonlarında 34 ailede 121 risk grubu kadın üzerinde yaptığı taramada, 2 nolu kromozom üzerinde bir pre-eklampsi lokusunun bulunduğunu net olarak göstermiştir. Bu gen PREG-1 (Pre-eklampsi geni-1) olarak adlandırılmıştır (25, 26).

Daha sonra Lachmeijer 2001 yılında Hollanda popülasyonunda yaptığı bir çalışmada, 2p kromozomu üzerinde pre-eklampsi ile ilgili bir bölge saptayamazken, 12q kromozomu üzerinde HELLP sendromu ile bağlantılı bir lokusun olabileceğini belirtmiştir(26). Finlandiya ve Çin popülasyonları üzerine yapılan genom tarama çalışmalarında 2p25 kromozomu (D2S168 markırına yakın bir lokus) ve 9p13 kromozomu üzerinde (D9S169 markırına yakın bir lokus) bulunan lokusların pre-eklampsiye yatkınlık genlerini bulduran lokuslar olabileceği ileri sürülmektedir. Bu çalışmaların toplamında 1, 2p, 3p, 4q, 9, 19q,

11q, 12q, 15q, 18 ve 22q kromozomları üzerinde hastalığa yatkınlık oluşturabilecek birçok aday gen ve lokus bulunmuştur (27).

Pre-eklampsinin fizyopatolojisine uyumlu olan bu aday genler, gebeliğin hemodinamik değişikliklerinde, trombofilide, immünogenetikte ve oksidatif streste yer alan aday genler olarak gruplandırılmaktadır (18).

Pre-eklampsi ile anjiotensinojen gen birlikteliğini ve maternal M235T (M: Methionin, T: Treonin) anjiotensinojen geninde meydana gelen moleküler bir değişiklik ilk olarak 1993 yılında tanımlamıştır. Beyaz ırk ve Japon populasyonlarında yapılan çalışmalarda, ayrıca İzlanda/İskoçya'da kardeş çiftleri ile yapılan bağlantı çalışmalarında pre-eklampsi ile M235T mutasyonu arasında anlamlı bir birliktelik olduğu rapor edilmiştir (25, 28, 29).

Ayrıca Kore populasyonunda, anjiotensinojen geninin promotor bölgesinde G(-6)A (G: Guanin, A: Adenin) mutasyonu sonucunda ortaya çıkan AA genotipinin gebelik sonucu ortaya çıkan hipertansiyon ile bağlantısı gösterilmiştir. Kore populasyonunda yapılan diğer bir çalışmada da, ACE (Anjiotensin-Converting Enzimini kodlayan gen) geninde meydana gelen moleküler bir değişikliğin pre-eklampsi ile bağlantılı olduğu gösterilirken, bu populasyonda anjiotensinojen geni ile pre-eklampsi arasında anlamlı bir birliktelik bulunamamıştır. Benzer çalışmalar, T235 allelinin HELLP sendromu için de bir risk faktörü olabileceğini göstermiştir (30).

Bu bulgulara karşıt olarak, Guo G. ve arkadaşları, Avustralya ve Çin populasyonunda hasta-kontrol çalışmasında pre-eklampsi-eklampsi ile M235T polimorfizmi arasında anlamlı bir birliktelik olmadığını göstermişlerdir. Ayrıca Romanya populasyonunda hamile kadınlar ile yapılan bir çalışmada da, M235T polimorfizminin orta ve ağır pre-eklampsi için bir risk faktörü oluşturduğu tespit edilmiştir (31).

1997 yılında İskoç/İzlanda ortak çalışmasında Arngrimsson ve arkadaşları, eNOS (endotelial Nitrik oksid sentaz) geni ile pre-eklampsi arasında bir bağlantısı olabileceğine dair kanıtlar bulmuşlardır. Bununla birlikte, Lewis, Amsterdam ve

İngiltere’ de benzer markırları kullanılarak yaptığı, tekrar niteliği taşıyan bir çalışmada, Arngrimsson ve arkadaşlarının elde ettiği bulguları onaylamamaktadır. Çin ve Avustralya populasyonlarında eNOS geninin polimorfik allel dağılımı, hasta ve kontrol grupları arasında farklılık göstermezken, iki etnik grup arasında bulunan fark anlamlıdır. Aynı şekilde, Japon ve Beyaz-Fransız populasyonları arasında yapılan karşılaştırma çalışmasında da benzer sonuçlar bulunmuştur. Ayrıca Japon populasyonunda yapılan diğer bir çalışmada bu polimorfizm ile pre-eklampsi arasında anlamlı bir birliktelik tespit edilmiştir (32, 33, 34). Bu birliktelik Doğu Finlandiya populasyonunda net olarak gösterilememiştir (35).

Hispanik populasyonunda ise, anjiotensinojen gen polimorfizmi hastalık için risk olarak gösterilmezken, eNOS geninin sadece küçük gebelik yaşında yüksek kan basıncı ile ilgili olduğu tespit edilmiştir (36).

Yapılan bazı çalışmalarda, pre-eklamptik kadınların plazma homosistein miktarının yüksek olduğu görülmüştür. Hiperhomosisteinemanın en yaygın nedeni, N⁵, N¹⁰ Metilen Tetrahidrofolat Redüktaz’ın (MTHFR) termolabil bir formunun oluşmasıdır. Avrupa ve Japon populasyonlarında MTHFR geninin C677T (C: Sitozin) polimorfizminin pre-eklampsili ve eklampsili hastalarda risk faktörü olabileceği buna karşın, İngiliz, Amerikan, Fin ve Güney Afrika populasyonlarında ise, risk faktörü oluşturmadığı rapor edilmiştir (37, 38, 39).

Son zamanlarda Avustralya populasyonunda yapılan bir çalışmada, C677T ve A1298C polimorfizmleri ile pre-eklampsi/eklampsi arasında anlamlı bir birliktelik bulunamamıştır (40).

Türkiye’de pre-eklampsili hastalarda yapılan bir çalışmada elde edilen hafif hiperhomosisteinemia bulgusunun, genetik orjinli, bağımsız bir faktörden daha çok damarsal bir hasar ve hipertansiyonun sonucunda meydana geldiği tespit edilmiştir (41).

Faktör V Leiden’in, gebelikte fizyolojik hiperkoagülasyonun yanı sıra plasentada trombüs artışına neden olduğu düşünüldüğünde, bu mutasyonun pre-eklampsi için kalıtsal bir risk faktörü olabileceği yargısına varılmaktadır. Beyaz

ırk populasyonlarında yapılan bir çalışmada pre-eklampsi ile faktör V Leiden mutasyonu birlikteliği rapor edilmiştir (42, 43).

İncelenen beyaz ırk populasyonlarında (Alman, Hırvat ve Endonezyalı) pre-eklampsi risk artışı ile Leiden mutasyonu arasında bir birliktelik tespit edilmiştir. Bu birliktelik Alman ve Hırvat populasyonlarında anlamlı bulunurken Endonezya populasyonunda anlamlı bulunmamıştır (44).

Anglikan ve A.B.D. populasyonunda faktör V Leiden ve MTHFR 677T mutasyonları birlikte incelenmiş, sonuç olarak kontrol ve hasta grubu arasında her iki gen polimorfizmi açısından fark olmadığı görülmüştür (45).

Obstetrik komplikasyonlar açısından beyaz kadınlar arasında trombofiliye neden olan diğer gen mutasyonları (MTHFR C677T, FVL, -455G/A beta-fibrinojen geni) ile protrombin G20210A mutasyonu birlikte incelendiğinde, pre-eklampsi ve kontrol grupları arasında allel sıklıklarının benzer olduğu bulunmuştur. Sonuç olarak, bu polimorfizmlerin gebelik komplikasyonlarının ortaya çıkmasında etkin olup olmadığı net olarak gösterilememiştir (46).

Pre-eklamptik kadınların plasenta ve plazmasında mRNA ekspresyonunda artışa bağlı olarak, PAI-1 (Plazminojen aktivator inhibitör tip 1) miktarında artış olduğu tespit edilmiştir. Japon populasyonunda PAI-1 geninin 4G/4G genotipinin pre-eklampsi için bir risk faktörü olabileceği rapor edilmiştir (47).

İtalya'da hafif pre-eklampsisi olan kadınlar arasında PAI-1 geninin -6754G/5G ve -844G/A genotip polimorfizmleri ile yapılan bir çalışmada, -6774G/5G allel dağılımı anlamlı olarak farklı iken, -844G/A allel dağılımında anlamlı bir farka rastlanmamıştır. Ayrıca hipofibrinolitik genotiplerin (4G/4G ve A/A) MTHFR, protrombin ve FVL'nin bulunduğu trombofilik mutasyonlardan bağımsız olarak hafif pre-eklampsi ile birliktelik gösterdiği bildirilmiştir (48).

Doğu Finlandiya populasyonundan alınan pre-eklampsi ve kontrol grupları arasında polimorfik allel dağılımı (4G/5G) açısından bir farka rastlanmamıştır. Elde edilen sonuçlar bu populasyonda, PAI-1 polimorfizminin pre-eklampsinin

patogenetiğinde önemli bir katkısının olup olmadığını net olarak gösterememiştir (49).

Kuzey Avrupalı kadınlar arasında yapılan bir çalışmada, kontrol grubuna göre pre-eklampsi hastalarında GPIIIa 98T allel sıklığının daha fazla olduğu bulunmuştur. Çalışma sonucunda bu polimorfizmin pre-eklampsi için daha önce tanımlanmamış bir risk faktörü olabileceği bildirilmektedir (50).

Diğer bir çalışmada Siyahi Güney Afrikalı pre - eklampsili kadınlarda PAI-1 geni 4G alleli ve platelet glikoprotein IIIa (PGIIIa)'nin PI^{A2} allel polimorfizmi incelenmiş ve sonuçlar anlamlı bulunmamıştır (51).

Güney Afrikalı Zulu kadınları arasında yapılan bir çalışmada, trombomodulin geni 455C (Sitozin) veya T (Timin) polimorfizmi ile pre-eklampsi/eklampsisi olan kadınlar arasında anlamlı bir birliktelik tespit edilememiştir (52).

Yine bu grup hastalarda endotel fonksiyon bozukluğu için önemli olan apolipoprotein-E polimorfizminin, hasta ve kontrol grupları arasında allel sıklıkları açısından herhangi bir farka rastlanmamıştır. Bu popülasyonda ilgili genin pre-eklampsi için risk oluşturmadığı görülmüştür (53).

HLA-G proteinlerinin farklı oranda ekspresyonunun pre-eklampsi ve eklampsinin patogenetiğinde etkin olabileceği düşüncesiyle Fransa'da yapılan bir çalışmada, pre-eklampsinin patogeneziinde HLA-G'nin anahtar rol oynadığı saptanmıştır (54).

IGF-II'nin pre-eklampsinin etiyolojisinde önemli rolü olduğu ileri sürülmektedir. İrlanda'da yapılan bir çalışmada, HLA-G geninin 2, 3 ve 8. ekzonları ve IGF-II polimorfizm yönünden incelenmiştir. İnceleme sonucunda, her iki gen bölgesinin de pre-eklampsi ile ilişkisinin olmadığı ortaya konmuştur (55).

Edinburg (İskoçya, Birleşik Krallık) popülasyonunda yapılan bir çalışma da HLA-sınıf II içerisinde yer alan HLA-DR4 antijenlerinin pre-eklampitik annelerde ve bebeklerinde birbirinden bağımsız olarak artış gösterdiği rapor

edilmiştir. Farklı çalışmalarda anne ve fetüs arasındaki HLA-DR4 antijen paylaşımı ve iddia edilen ilişki ne onaylanmış ne de bu fikir çürütülebilmştir. Bunun dışında Amerikan-İskoç populasyonlarının birbirinden bağımsız olarak yapılan analizlerinde, belirli B44-DR7 alleli bulunduran haplotiplerin pre-eklampsi riskini artırdığı temel düşüncesi yer almıştır. Ayrıca, pre-eklampsi için güçlü bir risk faktörü olan antifosfolipit antikor sendromu ile HLA-DR53 antijenleri arasında bir birliktelik olduğu rapor edilmiştir (56).

TNF reseptörlerinin plazma konsantrasyon artışı ile pre-eklampsi arasında bir birliktelik olabileceği düşüncesiyle yapılan çalışmalarda Chen ve arkadaşları TNF'in promotör bölgesinde -308 G (Guainin)→A (Adenin) değişimi sonucu meydana gelen TNF-T1 alleli ile pre-eklampsi arasında bir birliktelik olduğunu tespit ederken, diğer bilim adamları TNF-T1 veya T2 alleli için bu birlikteliği belirleyememişlerdir. Yine, pre-eklampsi, HELLP sendromu ve gebeliğe bağlı gelişen hipertansiyon tanısı konmuş 150 Hollanda'lı ailenin bulunduğu bir çalışmada, TNF -LT bölgesinde tespit edilen 9 adet polimorfizm değerlendirilmiş fakat bu gen polimorfizmlerinin ailesel pre-eklampsi ile herhangi bir birliktelik göstermediği belirlenmiştir. Sonuç olarak, TNF' in promtor bölgesinde yer alan polimorfizmlerin pre-eklampsi gelişimi için majör bir etken olmadığı varsayımında bulunulmuştur (57).

Finlandiya populasyonunda yapılan bir başka çalışmada da TNF geninin -850 promotor bölgesinde C (Sitozin)→T (Timin) polimorfizminin, bireysel pre-eklampsi riskini etkileyebildiği ve pre-eklampsi gelişimine karşı koruyucu olabileceği tespit edilmiştir (58).

Yine Finli eklampitik kadınlar arasında TNF geninin -307 pozisyonunda G→A polimorfizmi incelenmiş, kontrol grubuna oranla hasta grubunda TNF2 allel sıklığının anlamlı olarak daha fazla olduğu bulunmuştur. Bu populasyonda TNF2 allelinin, eklampsi gelişimine katkıda bulunduğu tespit edilmiştir (59).

Araştırmacıların bazıları, öncü interlökin-1 β geninde meydana gelen polimorfizmlerin pre-eklampsi gelişimi ile ilişkili olabileceği üzerinde durmuşlardır. Hispanik populasyonunda yapılan bir çalışmada, İnterlökin-1 β

geninin promotor bölgesinin -511'inci pozisyonunda Sitozinin Timine transisyonu sonucu meydana gelen değişimin pre-eklampsinin patogenezisinde etkin olmamakla birlikte, pre-eklampsinin şiddetinde etkin olabileceği bildirilmiştir (60).

Pre-eklampsi gelişiminde anneye ait metabolik sorunlarında katkısı olduğu bildirilmektedir. Pre-eklampside belirginleşen ve metabolik bir sorun olan dislipidemi, endotel hücrelerinde fonksiyon bozuklarına neden olmaktadır. Pre-eklampsi süresince HDL (yüksek dansiteli hipertrigiliserit) kolesterol konsantrasyonu azalmakta ve daha küçük fakat daha arterojenik bir değişken olan LDL oranının artması (düşük dansiteli protein) hiperlipidemisinin bir sonucu olarak ağır basmaktadır. Bu anormal lipitler pre-eklampside endotel bozukluğu teşvik edicileridirler. Hubel ve arkadaşlarının yaptığı bir çalışmada dört LPL gen polimorfizmi ile pre-eklampsi birlikteliği araştırılmıştır. Bu polimorfizmlerden ilki, ekzon-2'de D9N (D; Aspartik asit, N; nükleotid), ikinci, ekzon-6'da N291S (S; serin), üçüncüsü, LPL geninin promotore en yakın bölgesinde -93. pozisyonda T→G ve dördüncüsü ise, ekzon 9'da S447X (S; serin, X; dur kodonu) şeklindedir. Yapılan bir çalışmada N291S, D9N ve -93T→G polimorfizmlerini taşıyan bireylerin kalp-damar hastalığına ve dislipidemiye eğilimli olduğu bulunmuştur. LPL proteininde tespit edilen tüm mutasyonları taşıyan bireylerde anlamlı olarak pre-eklampsi riskinin arttığı gözlemlenmiştir (61).

Kim ve arkadaşlarının Kore popülasyonunda yaptığı D9N, -93T→G mutasyonları ile çalışma grubunda bir birliktelik bulamazken sadece hastaların küçük bir alt grubunda (doğum yapmamış kadınlar arasında) HELLP sendromu için risk artışı ile N219S mutasyonu arasında bir birliktelik tespit edilmiştir (62).

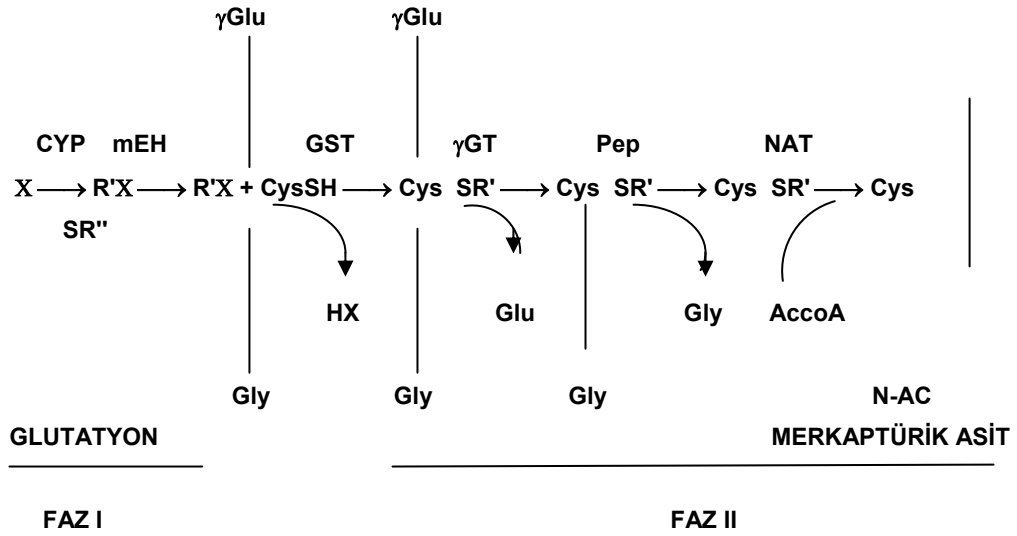
2. 6. Biyotransformasyon enzimleri ve detoksifikasyon mekanizmaları

Yapılan çalışmalar sonucunda; pre-eklampsi, eklampsi ve HELLP sendromunun fizyopatolojisine katkıda bulunabilen, detoksifiye edici ve temizleyici sistemler ile oksidatif strese neden olan serbest oksijen radikalleri ve

lipid peroksidleri gibi, toksik bileşikler arasında bir oransızlık olduğunu gösteren kanıtlarda artış gözlenmiştir. Bazı toksik bileşenler, vücuda alınan besinlerle, hava kirliliği sonucunda veya vücut içerisinde yapılmaktadır. Organizmalar bu toksik bileşiklere yada oksidantlara karşı enzimatik veya enzimatik olmayan savunma mekanizmaları geliştirmişlerdir. Bu mekanizmaların büyük bir çoğunluğunu karaciğerde bulunan enzimler gerçekleştirmektedir. Organizmanın içerisine alınan kimyasallar, bu enzimler sayesinde zararsız hale getirilmektedir, bu değişim “*biyotransformasyon*” olarak tanımlanmaktadır. Kimyasal maddeler ister biyolojik olarak aktif olsun ister olmasın, organizmanın değişik mekanizmalarında etki gösteren metabolitlere dönüşür ve daha sonra konjugasyonla inaktif hale getirilerek uzaklaştırılırlar. Toksik ürünleri zararsız hale dönüştürme mekanizmasına “*detoksifikasyon (zehirsizleştirme) mekanizması*” denir. Organizma için yabancı kimyasal maddelerin detoksifikasyon mekanizmaları, Faz I ve Faz II reaksiyonları olarak iki fazda toplanmaktadır (63).

Faz I enzim sisteminin başlıca bileşeni bir hemoprotein olan sitokrom P450'dir. Bu fazda lipitte çözünen yabancı bileşikler (ksenobiyotikler) daha polar moleküller haline dönüşmektedirler. Faz I, oksidasyon, hidroliz ve kopma reaksiyonlarının gerçekleştiği basamaktır. Bu olayda görev yapan enzimlerin aktiviteleri sırasında meydana gelebilecek her türlü hasar, enzimi bloke eder ve toksik bileşikler organizmaya zarar verir (6).

Faz II reaksiyonları, faz I reaksiyonları sonucu oluşan polar bileşiklerin konjugasyon reaksiyonlarının gerçekleştiği basamaktır. Konjugasyon reaksiyonları, kimyasal maddelerin organizmadaki endojen maddelerle (glukoronik asit, metil grubu, sülfat, aminoasit, asetil grubu gibi) birleşerek atılımları kolaylaşır ve böylece bu maddelerin toksisiteyi azalır. GST (Glutatyon-S-transferaz) ve NAT (N-asetil transferaz) faz II reaksiyonlarında rol oynayan önemli enzimlerdendir. Faz II'nin başlangıç evresinde, arzu edilmeyen yan etkilere sahip toksik ara ürünler ortaya çıkabileceğinden faz I ve faz II enzim aktiviteleri iyi koordine edilmelidir (Şekil 2.1) (64).

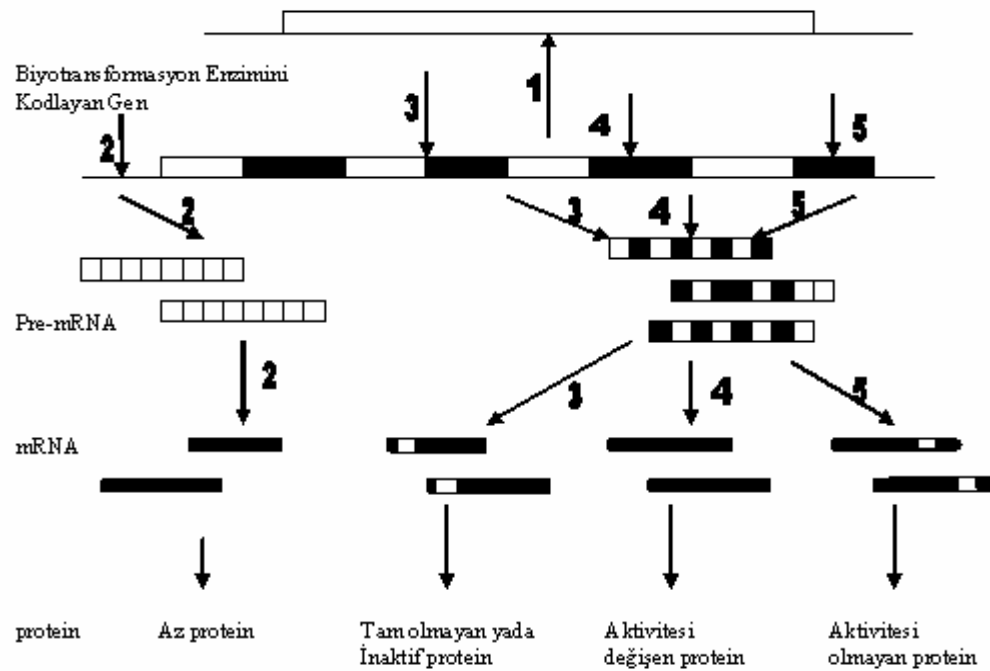


Şekil 2.1. Biotransformasyon enzimlerinin faz I ve II reaksiyonlarının basitleştirilmiş şeması.

Toksinlerin kimyasal modifikasyonu sitokrom P450 (CYP) ve hidroksil veya amino- grupları aracılığıyla yapılmaktadır (toksik bileşik X, geri kalan grup R ile gösterilmektedir). Bu reaksiyonları, genellikle Glutatyon S-transferaz (GST) aracılığıyla glutatyon (GSH) konjugasyonu ve merkaptürik asit yolunun sonraki basamakları takip etmektedir. γ -glutamil transferaz aracılığıyla (GT) γ -glutamil'in yarısı atılmaktadır. Atılan dipeptit sonradan konjugant bir ürün vermesi için sistein glisin dipeptaz (Pep) veya aminopeptidaz (pep) aracılığıyla bölünmektedir. Bu sistein konjugat, N-asetil transferaz (NAT) vasıtasıyla asetillenmektedir. Bu durum merkaptürik aside öncülük etmektedir (Gly: Glisin, AC-COA: Asetil koenzim-A).

Zenobiyotik metabolizmasında rol oynayan enzimleri kodlayan genlerde, bireyler arasındaki etnik farklılıklara, yaşam şekli ve çevresel faktörlere bağlı olarak, değişik polimorfik formlar oluşabilmekte ve bunların sıklıklarında da farklılıklar meydana gelmektedir. Genotipte meydana gelen değişiklikler fenotipe yansıyabilmekte ve enzim aktivitesinde değişikliğe neden olabilmektedir. Tüm

çevresel faktörlerin yanı sıra, biyotransformasyon enzimlerindeki genetik polimorfizm, bireyler arasındaki enzim aktivitesinde görülen farklılığın ana kaynağıdır. Biyotransformasyon enzimlerinin genetik polimorfizmine neden olan moleküler mekanizmanın çoğu bilinmemekle birlikte, mekanizmanın Şekil 2.2’de gösterildiği gibi olabileceği düşünülmektedir (6, 7).



Şekil 2. 2. Biyotransformasyon enzimlerinde meydana gelen polimorfizmin farklı moleküler mekanizması.

İntronlar açık, ekzonlar ise koyu renkle, genin düzenleme bölgesi ise gen bölgesinin başında bir çizgiyle gösterilmiştir.

1. İtron bölgesidir ve protein sentezinde gen bölgesinden çıkarılır. Protein sentezlenmez.
2. Düzenleme bölgesidir. Mutasyon olabilir. İşlevsiz protein oluşturabilir.
3. Mutasyon intron-ekzon sınırında olabilir. Tam olmayan yada inaktif protein oluşturabilir.

4. Mutasyon kritik olmayan amino asitte olabilir. Aktivitesi değişen protein oluşturabilir.
5. Mutasyon kritik amino asitte meydana gelebilir ve aktivitesi olmayan protein oluşturabilir.

Son yirmi yıl süresince plasenta içerisinde zenobiyotik biyotransformasyonun nasıl gerçekleştiği üzerine bir takım kabul edilebilir teoriler öne sürülmüştür. Bunlardan biri, yabancı moleküllerin fetüse ulaşmadan engellenmesine olanak tanıyan metabolit bir bariyerin bulunduğunu ileri sürmektedir ve bu bariyer aracılığıyla toksik bileşikler daha az zararlı bileşenlere dönüştürülmektedir. Pre-eklampsi, eklampsi ve HELLP sendromlu hastalarda sinsitotrofoblast membran parçaları, sitokinler ve toksik proteazlar gibi toksik bileşiklerin daha az zararlı hale dönüştürülmesini sağlayan biyotransformasyon enzimlerinde çeşitli polimorfizmlerin bulunduğuna dair çalışmalar vardır (65). Bu enzimler arasında sitokrom P450, glutatyon S-transferaz (GST) ve epoksid hidrolaz dikkati çekmektedir.

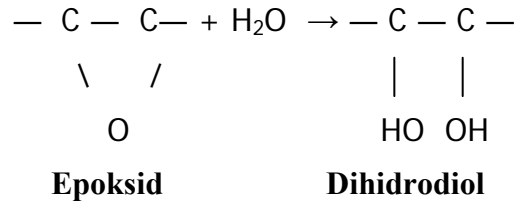
Karaciğer endoplazmik retikulumunda bulunan ve oksidasyon sisteminde işlev yapan sitokrom P450, karaciğer mikrozomlarında ve adrenal korteks mitokondrilerinde temel elektron taşıma zincirindeki en son enzim grubudur. Biyotransformasyon enzimlerinin faz I reaksiyonlarında yer alan en belirgin enzimdir. Sitokrom P450 enzimini kodlayan gen ailesi 19p13.2→qter kromozomal bölgede lokalize olmaktadır ve baz dizilimi benzerliklerine göre çok sayıda izoformu (CYP ailesi) vardır. CYP ailesi üyelerinin sahip oldukları polimorfizmlerin daha çok ilaç metabolizması ve kanser genetiğinde etkin olduğu gözlenmiştir. Pre-eklampsi, eklampsi ve HELLP sendromu ve sitokrom P450 enzim polimorfizmleri ile ilişkili bir çalışma Hollanda'da yapılmıştır. Bu çalışmada GSTP1 enzim polimorfizmi ile CYP1A1 geninin 7.ekzonda A4889G transisyonu sonucu oluşan Ile (Izolösin)→Val (Valin) polimorfizminin, pre-eklampsi hikayesi olan kadınlarda HELLP sendromu gelişime riskini etkilemediği kanısına varılmıştır (66).

Oksidatif strese rol oynadığı düşünülen diğer bir enzim grubu da GST enzim ailesidir. GST'ler karsinojen ve mutajenleri içeren çeşitli hidrofobik ve elektrofilik substratların glutatyonun (GSH) tiol (SH) grubu ile konjugasyonunu sağlayan çok işlevli bir enzim ailesidir. İnsan sitosolik GST'lerin polimorfizm sıklıkları etnik özelliklere bağlı olarak değişmektedir. İnsanlarda A (Alfa), M (Mu), T (Theta) ve P (Pi) olarak dört büyük alt gruba ayrılan GST ailesi sırasıyla 6, 1p13.3, 22 ve 11q13nolu kromozomal bölgelerde lokalize olmaktadır. Bu enzim gruplarını kodlayan genlerde meydana gelen değişiklikler enzim aktivitesini değiştirebilmektedir. Bu düşüncelerle yola çıkan araştırmacılar, Hollandalı beyaz kadınlar arasında yaptıkları bir çalışmada GSTM1, GSTT1 ve GST P1-1 gen polimorfizmi ile pre-eklampsinin fizyopatolojisi arasında bir ilişki olabileceği olasılığını incelemiştirler. Polimorfizm, GSTM1 ve GSTT1 genlerinde delesyon şeklinde, GSTP1 geninde ise 313. pozisyonda A→G değişimi sonucunda, proteinin 105. pozisyonunda Ile→Val amino asidinin kodlamasıyla oluşmaktadır. GSTM1 ve GSTT1 genotip sıklıkları hasta ve kontrol grubunda anlamlı bir fark göstermezken, pre-eklamptik hasta grubunda GSTP1 geninde bulunan bu mutasyonun allel sıklığı (hasta grubunda %14, kontrol grubunda %5) kontrol grubuna göre daha yüksek bulunmuştur. Sonuç olarak GSTP1-1b genotipinin kadınlarda glutatyon-S-transferaz detoksifikasyon kapasitesini azaltmasından dolayı pre-eklampsisi gelişimine eğilimini artırdığı tespit edilmiştir (66, 67).

Pre-eklampsisi, eklampsisi ve HELLP sendromu gelişmesinde etkin olabileceği düşünülen diğer bir biyotransformasyon enzim grubu da epoksid hidrolazlardır (EH). Esasında epoksid hidrolazlar, kimyasal olarak reaktif epoksidlerin dihidrodiol ürünlerine hidrasyonunu katalizleyen bir protein sınıfıdır. Basit epoksidler benzer dihidrodiollere hidrate olurken, aren oksidler de trans-dihidrodiollere dönüşürler. Epoksid hidrolazlar, moleküler ağırlıkları, substrat özgülüğü, biyo-fiziksel ve immünolojik özellikleri göz önüne bulundurulmuş 5 grup altında toplanmıştır. Bunlar: mikrozomal, çözünür (veya sitosolik), kolesterol epoksid hidrolazlar, hepoksilin A₃ hidrolaz ve lokotrin A₄ hidrolaz şeklinde sıralanır (8).

2. 6. 1. Mikrozomal epoksid hidrolaz enzimi ve detoksifikasyon mekanizması

Bir organizmanın reaktif kimyasalları daha az zararlı maddelere dönüştürme kabiliyeti toksik etkileri azaltmak açısından önemlidir. Mikrozomal epoksid hidrolazı kodlayan gen (EPHX), belirli zenobiyotik kimyasallarla transkribe olur. Ortaya çıkan protein ürünü (mikrozomal epoksid hidrolaz enzimi-mEH), yabancı moleküle suyun çapraz bağlanmasını sağlayarak, toksik molekülü suda daha fazla eriyebilen dihidrodiol türevlerine, faz I tepkimelerinin hidrolizini katalizleyerek dönüştürürler (şekil 2.3) (9). Böylece bu zararlı bileşiklerin vücuttan daha kolay atılmaları sağlanmış olur. Epoksid hidrolaz, basit alifatiklerden büyük polisiklik aromatik hidrokarbonlara kadar geniş substrat özgüllüğü göstermektedir. Epoksidler, monooksijenazların prokarsinojen substratlar üzerine yaptıkları etkiler sonucu ortaya çıkan ürünlerdir. Bu maddeler enzimatik olarak endojen ve zenobiyotik maddelerin oksidatif metabolizması süresince hücre ve dokularda oluşmaktadır. Epoksidler, ileri derecede etkin mutajenik veya karsinojenik olabilecekleri gibi her iki özelliğe de sahip olabilirler. Bu özelliklerini, hücresel makromoleküllerle (DNA, RNA, proteinler) etkileşime girerek göstermektedirler (68).



Şekil 2.3. Vücut için zararlı bileşenler olan epoksidlere bir molekül suyun eklenmesi ile oluşan daha az zararlı dihidrodiol ürünü.

Bundan başka, mikrozomal epoksid hidrolaz (mEH) hepatositlerin düz endoplazmik retikulum vesikülleri içerisinde safra asitlerinin taşınmasına da aracılık etmektedir (69).

2. 6. 2. mEH enzim polimorfizmleri ve pre-eklampsi, eklampsi, HELLP sendromu arasında risk ilişkisi

Ratlar, tavşanlar ve insanlardan izole edilen mikrozomal epoksid hidrolaz enzimi karşılaştırıldığında, insanlarda bu enzim yalnızca endoplazmik retikulum zarlarında bulunduğu tespit edilmiştir. İnsan mikrozomal epoksid hidrolaz enzimini 1q42.1 kromozomal bölgede lokalize olan fonksiyonel tek bir gen aracılığıyla kodlanmaktadır. Sekiz intron ve dokuz ekzondan oluşan bu gen, 455 amino asit içeren bir protein sentezlemektedir. Genin farklı hücre tiplerinde ekspresse olduğu ve protein ürününün de (mEH enzimi) tüm organlarda bulunduğu gösterilmiştir. Bazı çalışmalarla, gende meydana gelen polimorfizmlerin enzim aktivitesinde değişikliklere yol açtığı bildirilmiştir (70). Ayrıca son yıllarda yapılan çalışmalarda, enzim aktivitesinde meydana gelen değişikliklerin pre-eklampsi benzeri hastalıklara bireysel yatkınlığı artırdığı da düşünülmektedir. Hollanda popülasyonunda yapılan bir çalışmada, pre-eklampsi ve HELLP sendromu tanısı konmuş hastalarda EPHX geni ekzon-3 ve ekzon-4 polimorfizmleri incelenmiştir. EPHX geninin 3. ekzonunda Timinin (T) yerini Sitozinin (C) almasıyla (113. kodonda Tirozin (Tyr) Histidine (His) dönüşmesiyle) oluşan polimorfizmin enzim aktivitesini %40 azalttığı tespit edilmiştir. Bu incelemeye dayanarak 113His alleli *yavaş allel* olarak adlandırılmıştır. Genin 4. ekzonunda Adenin yerini Guaninin alması ile 139. kodonda Histidin amino asidinin Arjinine (Arg) dönüşmesiyle meydana gelen polimorfizm, enzim aktivitesini yaklaşık olarak %25 artırdığı gözlemlenmiştir. Buna bağlı olarak 139 Arg alleli *hızlı allel* olarak adlandırılmıştır. Çalışma sonucunda, kontrol grubu ile karşılaştırılan pre-eklampsi/HELLP sendromlu hasta grubunda 113Tyr/113Tyr homozigot oranının daha yüksek olduğu bulurken, 139His→139Arg polimorfizm dağılımı açısından gruplar arasında bir fark

bulanamamıştır. Bu bulgulardan yola çıkarak endojen veya ekzojen toksik bileşiklerin metabolik aktivasyonunda farklılıklara neden olan 3. ekzonda hızlı aktivite genotipinin pre-eklampsiye yatkınlığı artırabileceği ifade edilmiştir. Bununla birlikte EPHX geninde meydana gelen bu polimorfizmlerin pre-eklampsinin yanı sıra HELLP sendromu gelişiminde risk oluşturmadıkları bildirilmiştir (10). Benzer bir çalışma Finlandiya popülasyonunda yapılmış, çalışma sonucunda, Timin-Adenin (113Tyr ve 139Arg) haplotip sıklıklarının pre-eklampsi ile anlamlı bir birliktelik gösterdiği tespit edilmiştir. Ayrıca Hollandalı pre-eklamptik hastalarda yapılan çalışmada, bu belirli haplotiplerin pre-eklampsi gelişiminde risk artışına neden olabileceği belirtilmiştir (11).

2. 6. 3. Mikrozomal epoksid hidrolaz enzim polimorfizmleri ve diğer hastalıklarla ilişkisi

EPHX geninin yapısal bölgeleri içinde meydana gelen genetik polimorfizmler bulunmaktadır. Bu polimorfizmler, fonksiyonel ekspresyon açısından popülasyonlar arasında farklılıklara neden olmaktadır. Bu polimorfizmlerden biride EPHX geninin 5' ucunda meydana gelmektedir. Bu bölgede şimdiye kadar transkripsiyon başlama bölgesine yakın -743 bç'den 185 bç'ne kadar olan 7 adet polimorfik bölge tanımlanmıştır. EPHX geninin 5' bölgesinde bulunan bu polimorfik lokusların genin transkripsiyonal aktivitesini farklı oranlarda değiştirdiği tespit edilmiştir. EPHX geninde meydana gelen polimorfizmlerin kanser gelişiminde bireysel yatkınlığı etkilediği ifade edilmektedir (71).

Son zamanlarda Japonya'da 96 epileptik hastalarının yer aldığı bir çalışmada, EPHX geninin tüm ekzon ve intronların nükleotid dizilimi yapılarak beş yeni tek nükleotit polimorfizmi bulunmuştur. Bu polimorfizmlerden biri, translasyonel başlama kodonu olarak, diğerleri ise ekzon-2'de, ekzon-8'de, intron-8'de ve ekzon-9'da meydana gelmektedir. Fakat bu polimorfizmlerin günümüz için ve epileptik ilaçların detoksifikasyon mekanizması için nasıl bir biyolojik anlam taşıdığı henüz tespit edilememiştir (72).

Beyaz ırk populasyonlarında tüm over kanserleri üzerine Tyr113His polimorfizminin etkisi araştırılmış, over kanseri risk artışı ile yüksek enzim aktivitesine neden olan 113Tyr genotipi arasında anlamlı bir birlikteliğin olduğu tespit edilmiştir. Bu durumun, endojen veya ekzojen karsinojenlerin metabolik aktivasyonundaki farklılıklardan kaynaklanabileceği düşünülmüştür (73). Yine İngiliz kökenli bir populasyonda, benzer bir hasta-kontrol çalışmasında, EPHX geni hızlı ve yavaş aktivite allel polimorfizmlerinin over kanser riski ile ilişkisi araştırılmış ve her iki polimorfizmin over kanseri için, bu populasyonda risk artışına neden olmadığı bulunmuştur (74).

Avustralya populasyonunda yapılan diğer bir çalışmada, over kanseri olan kadınlar ile kontrol grubunda, 113Tyr→113His polimorfizm oranları ve sigara kullanımının over kanserine etkisi değerlendirilmiştir. Sigara kullanımına bağlı oluşan bileşiklerin mutajenik formlara dönüşmesine neden olan biyotransformasyonun, over kanseri oluşumunda genellikle etken olmadığı buna karşın, detoksifikasyon oranının yüksek olmasının, endometrial over kanseri riskini azalttığı ifade edilmektedir (75).

Yine EPHX gen polimorfizmi ile sigara kullanımı ve çeşitli kimyasallara bağlı gelişen akciğerlerin bazı hastalıkları arasında bir ilişki olabileceği düşünülmüştür. Sigara içimi ve meslekle ilişkili olarak çeşitli kimyasal ve çözücü maddelere maruz kalmaya bağlı hücre ve dokularda hasar oluşabilmektedir. Bu hasar sonucu kronik obsrükatif pulmoner hastalığı (COPD) ve anfizem hastalığı ortaya çıkmaktadır. İngiltere yapılan hasta-kontrol çalışmasında, Tyr113His ve His139Arg polimorfizmlerinin dağılımları değerlendirilmiş, anfizem ve COPD hastalarında yavaş aktivite allel (113His ve 139His) sıklığının kontrol grubuna göre anlamlı olarak daha fazla olduğu tespit edilmiştir. Çalışma sonucunda, zenobiyotikleri metabolize eden enzimlerde meydana gelen polimorfizmlerin bazı akciğer hastalıklarının gelişmesinde bireysel yatkınlık oluşturabileceği yargısına varılmıştır. Ayrıca sigara-tütün bileşenlerinin ortaya çıkardığı epoksid türevlerinin bu hastalıkların fizyopatolojisinde etken olan bazı akciğer hasarlarının nedeni olabileceği de açıklanmıştır (76). Benzer bir çalışma da Japon populasyonunda

yapılmıştır. Sigara içen ve anfizemi olan bireyler ile sigara içen, anfizemi olmayan bireyler arasında EPHX ekzon-3 ve ekzon-4 polimorfizm dağılımları karşılaştırılmış ve gruplar arasında anlamlı bir fark bulunamadığından, bu polimorfizmlerin Japon populasyonunda, anfizeme yatkınlık oluşturmadığı yargısına varılmıştır (77).

Japonya'da EPHX'in yanı sıra CYP1A1, GST (T1, M1, P1) ve HMOX1 (homoksigenaz 1) enzimlerini kodlayan genlerdeki polimorfizmlerin anfizem gelişimine etkileri araştırılmış ve sadece EPHX ve HMOX1 gen polimorfizmlerinin oluşturduğu bir kombinasyonun anfizemin gelişmesinde etkin olduğu tespit edilmiştir (78). Kore'de yoğun sigara içimine bağlı COPD hastalığı gelişen bireyler ile kontrol bireylerinin EPHX ekzon-3 ve ekzon-4 polimorfik genotip sıklıklarını karşılaştırılmış ve bir fark bulunmadığı tespit edilmiştir. Sonuç olarak, bu genetik polimorfizmlerin COPD gelişiminde etkin olmadığı bulunmuştur (79).

Tayvanlılar arasında EPHX Tyr113 polimorfizmi ve GSTP1 null allel polimorfizmi taşıyıcılarının COPD yatkınlığı olduğu ve bu iki polimorfizmin, ağır COPD gelişiminde birbirinden bağımsız birer risk faktörü oldukları tespit edilmiştir (80).

1,3-Butadien (BD) sentetik kauçuk ve çeşitli plastik maddelerin yapımında kullanılan önemli kimyasal bir üründür. Bu ürünlerin insan ve hayvanlar için genotoksik ve karsinojenik olma potansiyeli olduğu bildirilmektedir. Ayrıca genetik hasara ve tartışmalı bir konuda olsa insanlarda hematolojik malignansilere neden olduğu düşünülmektedir. Güneydoğu Teksas'da yapılan bir çalışmada, bu kimyasallara belli oranlarda maruz kalmış ve sigara içmeyen işçilerde EPHX geni Tyr113His polimorfizm birlikteliği değerlendirilmiştir. Sonuç olarak, BD kimyasalına maruz kalan işçilerde, bu polimorfizmin genotoksik etkilerin ortaya çıkmasında, duyarlılığı arttığı tespit edilmiştir (81).

Çek Cumhuriyeti'nde yapılan küçük bir çalışmaya dayanarak Çin populasyonunda, işçilerde küçük miktarlarda BD'ye maruz kalmanın genetik hasar için risk oluşturmadığı yargısına varılmıştır. EPHX (His139Arg) ve GST

polimorfizmlerinin bu genotoksik risk ile anlamlı bir birlikteliği bulunamamıştır (82).

Benzo[a]piren, tütün dumanında bulunan önemli bir kanserojendir. Mikrozomal epoksid hidrolaz bu kanserojenin metabolizmasına katılan enzimlerinden biridir. Farklı populasyonlarda yapılan çalışmalarda EPHX gen polimorfizmi ile akciğer kanser riski arasında bir birlikteliğin olabileceği bildirilmektedir. Bir hasta-kontrol çalışmasında, ekzon-3'de yavaş allelin homozigot olarak bulunmasının Afrikalı-Amerikan populasyonunda, akciğer kanser riskini azalttığı gözlemlenirken, oldukça değişken olan beyaz bireyler arasında böyle bir birliktelik tespit edilememiştir. Bu bulgular, 113 His/113His polimorfizminin akciğer kanserine karşı koruyucu olabileceğini düşündürmüştür (83). Beyazlar arasında yapılan daha küçük bir çalışmada, yine akciğer kanserinin farklı alt tiplerinde (adeno-karsinoma: AC ve yassı hücre karsinoması: SCC) artan oranlarda sigara içimi ile EPHX polimorfizmleri arasındaki ilişki araştırılmıştır. Çalışma sonucunda, çok yavaş aktivite genotipinin, sigara içmeyen bireylerde kanser için risk oluşturabileceği yada ağır içicilerde bu polimorfizmin nispi oranda koruyucu olabileceği yönünde yorumlarda bulunulmuştur (84).

Aynı araştırmacılar bir hasta-kontrol çalışmasında 1115 akciğer kanseri hastası ile bu hastaların eş ve akrabalarından oluşan 1250 beyaz bireyde artan oranlarda sigara kullanımı, akciğer kanseri ve EPHX polimorfizminin yanı sıra N-Asetiltransferaz polimorfizm ilişkisini incelemiştir. Çalışmanın sonucunda her iki enzim polimorfizminin de, akciğer kanseri üzerine birbirinden bağımsız olarak etki gösterdiği ve sigara kullanımının da bu etkileri değiştirdiği tespit edilmiştir (85).

EPHX polimorfizmleri ile ilişkisi olduğu düşünülen diğer bir hastalık grubu da kolorektal adenomlardır. Kolorektal kanserlerin, diyetle ve sigara kullanımı aracılığıyla vücuda alınan polisiklik hidrokarbanların (sigara dumanında ve ızgara yapılan et ürünlerinde bulunmaktadır) genotoksik etkileri sonucunda oluşabileceği düşünülmektedir. Bu toksik maddeleri vücutta detoksifiye eden

enzimlerin aktivitesinde yaşanacak problemlerin hastalığın ortaya çıkmasında etken olabileceği bildirilmiştir (86, 87).

Ağız, yutak (farenks), gıtlak (larenks) ve yemek borusu (özefagus) kanserlerinde epoksid hidrolaz polimorfizmleri aday olarak düşünülmüştür. Bu malignensilerin gelişmesinde başlıca risk faktörleri, tütün kullanımı ve alkol tüketimidir. Kanser riskini etkileyen diğer bir unsur da, karsinojen metabolizmasında yer alan enzimleri kodlayan genlerdeki polimorfizmlerdir (88).

Hodgkin ve non-Hodgkin lenfomalarda da EPHX polimorfizmleri etken olarak gösterilmiştir. Petro-kimya endüstri ürünlerinde (nitratlar, pestisitler, herbisitler ve çözücülerin bulunduğu kimyasallar) ve sigara dumanında bulunan benzen kanserojenine maruz kalmaya bağlı olarak lenfoma tipi hematolojik kanserler gelişmektedir. Çek Cumhuriyeti'nde ve Norveç'te yapılan hasta-kontrol çalışmalarında CYP1A1, CYP2E1, GST (T1, M1, P1) ve EPHX polimorfizmlerinin hastalık oluşumunda bireysel yatkınlığı etkilediği düşünülmüş, her iki çalışma sonucunda da bu genetik polimorfizmlerin, lenfoid malignensilerin gelişmesinde ve ilerlemesinde anlamlı rollerinin olduğu bildirilmiştir (89, 90).

EPHX polimorfizmlerinin aday gösterildiği hastalıklardan biri de hepatosellüler karsinomadır (HCC). Bu hastalığın gelişmesinde kronik hepatit enfeksiyonu veya sağlıklı depolanan mısır ve Amerikan fıstığı'nda oluşan *Aspergillus* fungi tarafından yapılan aflatoksin önemli risk faktörleridir. Aflatoksinin en mutajenik ve karsinojenik şekli AFB1'dir. AFB1'in metabolitinin DNA üzerine yaptığı mutajenik etki sonucunda kanser gelişebilmektedir. Detoksifikasyon mekanizması, aflatoksinin toksik etkisini önleyerek DNA'yı korumaktadır. Sudan'da yapılan bir çalışmada GST ve EPHX polimorfizmlerinin hepatosellüler karsinoma üzerine etkisi incelenmiş ve her iki enzimin de aflatoksin mekanizmasında anlamlı rollerinin olmadığı buna karşın, EPHX polimorfizminin kanser gelişime riskini değiştirdiği düşüncesinden yola çıkarak HCC oluşumunda da risk artışına neden olabileceği bildirilmiştir (91).

New York'da yapılan hasta-kontrol çalışmasında EPHX polimorfizmlerinin meme kanseri oluşmasında anlamlı bir faktör olabileceği

düşünülmüş, sigara kullanımı ve menopozun bu hastalığın oluşmasında risk artışına neden olup olmadığı değerlendirilmiştir. Sonuç olarak, bu popülasyonda bu polimorfizmlerin göğüs kanseri riskini artırmadığı yargısına varılmıştır (92).

Biyotransformasyon enzimlerini kodlayan genlerde meydana gelen değişikliklerin miyokardial infarktüs riskini değiştirebileceğini düşünen araştırmacılar, İngiltere’de akut miyokard enfarktüsü geçiren bireylerde bu hastalığa GST ve EPHX gen polimorfizmlerinin katkılarını incelemiştir. EPHX polimorfizmleri hastalık için herhangi bir risk teşkil etmemesine karşın GSTM1 delesyon taşıyan genotipinin (null genotip) enfarktüs için koruyucu olabileceği bildirilmiş, özellikle de sigara kullanan hastalarda bu bulgunun daha dikkat çekici olduğu tespit edilmiştir (93).

EPHX gen polimorfizmlerinin aday olarak gösterildiği diğer bir hastalık da hiperkolonemia’dır. Hiperkolonemianın nedenleri arasında EPHX polimorfizmleri de yer almaktadır. Bu polimorfizmlerden biri genin 5’ ucunda -4238. bölgede Timinin Adeninle yer değiştirmesi ile (allel I), ikincisi ise 1.intronda 2557. pozisyonda Sitozinin Guaninle yer değiştirmesi (allel II) sonucunda oluşmaktadır. mEH enzimi, karaciğerde sodyuma bağlı safra asidi alımında işlev yapmaktadır. Bu enzimin yokluğuna neden olan polimorfizmlerin, hastada hiperkolonemia etiyolojisine katkıda bulunduğu görülmüştür (94).

2. 7. Polimorfizmin Tanımı ve Genetik Polimorfizmin Saptanmasında Kullanılan Yöntemler

Poli ve morfizmos kelimelerinden oluşan polimorfizm, eski Yunanca’da “çok şekillilik” anlamı taşıyan bir sözcüktür.

Genetik polimorfizm, bir popülasyonda, farklı allellere bağlı olarak, genetik olarak belirlenmiş iki veya daha çok alternatif fenotipin görülmesidir.

Popülasyon genetikçilerine göre, bir gen lokusu, nadir alleller en az %1 frekansına sahip oldukları ve sonuçta bu alleller için heterozigotlar en az %2 oranında görüldükleri takdirde polimorfik olarak tanımlanırlar. Popülasyon genetiği açısından belli bir frekansa gereksinim olmasına karşın, moleküler biyoloji

açısından, frekansın önemi olmayıp, bir ailede dahi görülen varyant polimorfik adını almaktadır.

Polimorfizmler, türlerin buldukları ortama adaptasyonlarını kolaylaştırarak, evrimsel süreçte ayakta kalabilmelerine olanak verir.

Polimorfizm, tüm birey düzeyinde (fenotip), proteinlerin ve kan grubu bileşiklerinin varyant formlarında (biyokimyasal polimorfizm), kromozomların morfolojik özelliklerinde (kromozomal polimorfizm) veya DNA düzeyinde nükleotid farklılıkları (DNA polimorfizmi) şeklinde görülebilir.

Genetik polimorfizmlerin belirlenmesinde PCR, RFLP, VNRT (variable number of tandem repeats: değişken ardışık tekrarlar), SSCP (single stranded conformational polymorphism: tek iplikçik yapısal çeşitlilik) laboratuvar yöntemleri kullanılmaktadır. Polimorfizm çalışmalarında elde edilen bulgular, hastalıklara yatkınlığın belirlenmesinde ve tedavinin yönlendirilmesinde önem taşımaktadır (95).

2. 7. 1. PCR (Polymerase Chain Reaction)

Polimeraz zincir reaksiyonu (PCR), spesifik bir DNA parçasının primerler tarafından yönlendirilerek, enzimatik olarak sentezlenmesi şeklinde tanımlanan *in vitro* bir yöntemdir. Bu reaksiyon 1988 yılında Kary Mullis tarafından geliştirilmiş ve bu yıldan sonra, rekombinant DNA yöntemleri ve DNA klonlanmasına ek olarak, *in vitro* koşullarda istenilen bir genin yada özgün bir DNA dizisinin çok sayıda kopyasını elde etmek için kullanılmıştır. PCR yöntemi temel moleküler biyoloji araştırmalarında (klonlama, dizi analizi ve DNA haritalaması gibi) ve birçok hastalığın (orak hücre anemisi, kistik fibrosis, faragil X sendromu, AIDS, lösemi vb.) DNA temeline dayalı tanısının belirlenmesi açısından klinik tıpta hızla kullanılmaya başlanmıştır. PCR ile insan genomik DNA'sı gibi kompleks DNA kalıplarından spesifik DNA parçalarının sentezinin birkaç saat içinde gerçekleştirilmesi, bu teknolojinin yaygınlaşmasında başlıca neden olmuştur. Günümüzde, polimeraz zincir reaksiyonunu, doku transplantasyonu için doku tipinin belirlenmesinde, adli tıp örneklerinin genetik tiplendirilmesinde (analık-babalık tayini), tarımda (tohum saflığının belirlenmesi),

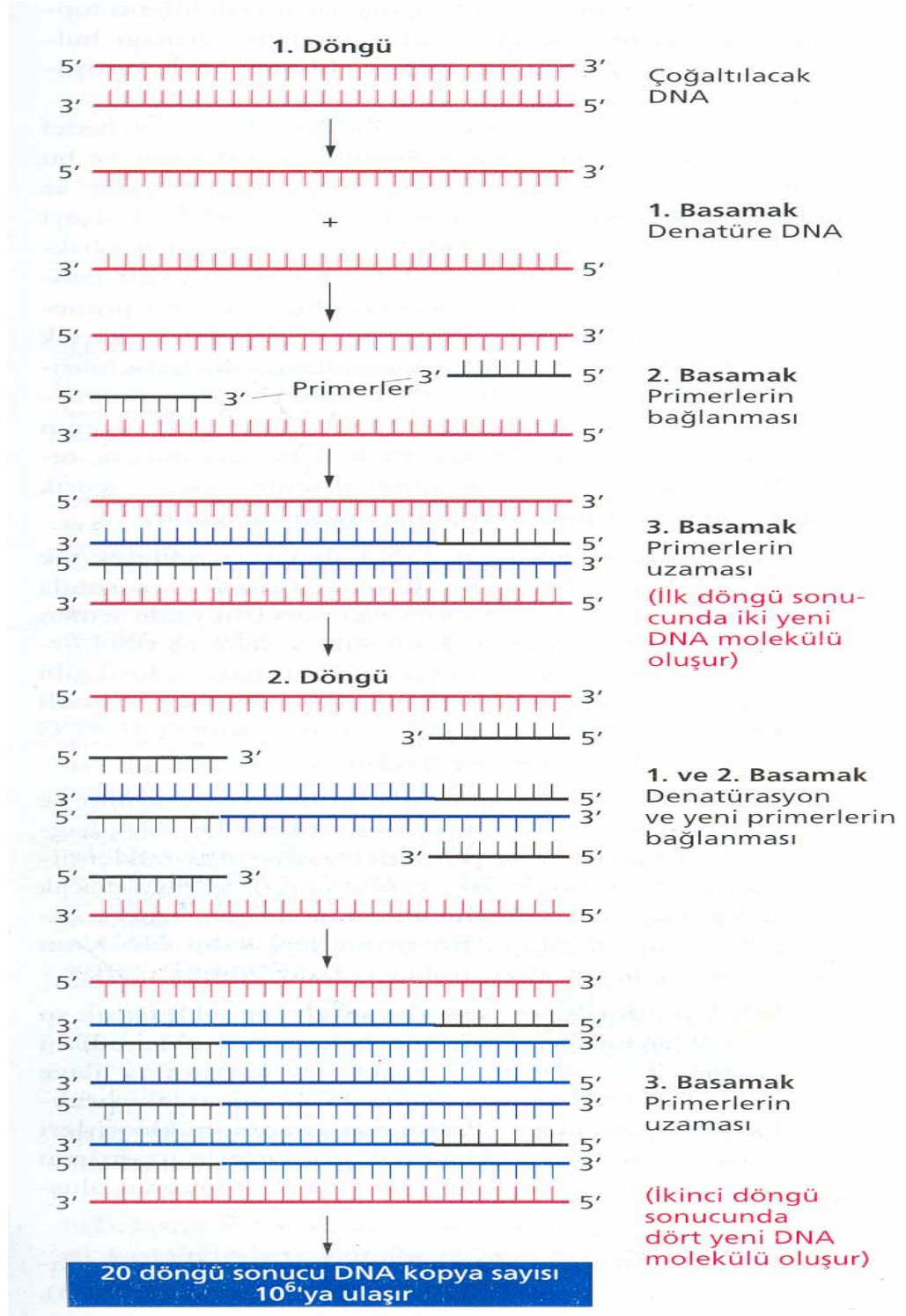
sistematik ve evrim çalışmalarında (doğadaki çeşitli canlı türlerinin tanısı, türler arasındaki polimorfizmin belirlenmesi) kullanmak mümkün olmuştur.

Polimeraz zincir reaksiyonu çift iplikli bir DNA molekülünde hedef dizilere iki oligonükleotid primerin bağlanması ve uzaması esasına dayanır. Oligonükleotid primerler, kalıp DNA molekülü yüksek sıcaklık derecelerinde denatüre edildikten sonra, tek iplikli DNA molekülleri üzerinde kendilerine tamamlayıcı olan bölgelerle birleşirler. Primerlerin spesifik olarak hedef dizilere bağlanması düşük sıcaklık derecelerinde gerçekleşir. DNA polimeraz enzimi, uygun tampon ve dört çeşit dNTP (deoksiribonükleozid trifosfat) varlığında primerlerin 3' hidroksil ucundan uzamasını sağlar. Böylece kalıp DNA iplikçiğine tamamlayıcı olan yeni DNA molekülü sentezlenmiş olur. Bir PCR döngüsü denatürasyon, primerlerin bağlanması (annealing) ve uzama (extension) olarak adlandırılan üç aşamadan oluşur. Ardı ardına tekrarlanan denatürasyon, primerlerin bağlanması ve uzama evreleriyle DNA fragmentleri üssel olarak artar (Şekil 2). Bu üssel artışın nedeni, bir döngü sonucu sentezlenen ürünün, ardışık döngüde diğer primer için kalıp görevi yapmasıdır. Böylece her PCR döngüsü DNA molekülü üzerinde istenilen bölgenin iki katına çıkması ile sonuçlanır. PCR boyunca biriken ürünlerin boyu iki primerin boyu ve hedef DNA bölgeleri arasındaki mesafelerin toplamı kadardır.

PCR verimini etkileyen önemli bir faktör, DNA polimeraz enzimidir. Termotabil enzimlerden en yaygın olarak kullanılan *Thermus aquaticus*'dan elde edilen Taq DNA polimerazdır. Normalde enzim miktarı 25-30 PCR döngüsü sonucunda hedef dizi artışı ve termal denatürasyon nedeniyle sınırlayıcı bir etken haline gelir. Daha ileri amplifikasyon gerekli ise, amplifiye olmuş DNA örneği 1000-10000 kez sulandırılarak yeni PCR'ler için kalıp olarak kullanılmaktadır. Verimliliği azaltan bir diğer faktörde konsantrasyonu artan hedef dizilerin primer ile bağlanma yarışıdır.

PCR ürünleri genellikle jel elektroforezi ile analiz edilmektedir. Elektroforez sonrası etidium-bromid kullanılarak boyanan DNA bantları rahatlıkla gözlenmektedir.

Bu yöntemin en önemli avantajı, herhangi bir canlıdan elde edilen DNA molekülü kolaylıkla çoğaltılabilesidir. Hızlı ve kolay bir tekniktir (95, 96).



Şekil 2.4. Polimeraz Zincir Reaksiyonu (PCR)

2. 7. 2. Restriksiyon Fragment Uzunluk Polimorfizmi (RFLP)

Restriksiyon enzimleri, bakterial virüslerin meydana getirdiği enfeksiyonlara karşı savunma ajanları gibi işlev gören prokaryotik proteinlerdir. Bu enzimin keşfine yol açan ilk gözlemler, bazı bakteri soylarının “*konakçı kontrolündeki sınırlama*” (*host-controlled restriction*) olarak anılan bir fenomen olan bakteriofaj enfeksiyonlarına bağışıklığın gösterildiği zaman olan 1950’lerin başlarında yapılmıştır. Bu enzim bakterilerde doğal olarak bulunur ve bakteriyi yabancı DNA’lara karşı korumaktadır. Bugüne kadar 1200’ün üzerinde enzim tanımlanmıştır. Restriksiyon endonükleazların üç ayrı sınıfı bulunmaktadır. İşlev olarak birbirinden çok az farklılık göstermektedir. Diğer yandan, tip II restriksiyon endonükleazlar gen klonlanmasında oldukça önemli olan kesici enzimlerdir. Tip II restriksiyon endonükleazlar genellikle 4, 5 veya 6 baz çifti (bç) uzunluğunda olan spesifik bir nükleotid dizisini tanır ve bu dizilerdeki metillenmemiş çift-zincirli DNA molekülünü keser (97).

RFLP, bir restriksiyon endonükleaz ile DNA’nın kesilmesi üzerine dayandırılmış bir yöntemdir. Genetik hastalıkların moleküler genetik tanısında kullanılan önemli bir yöntemdir. Enzimin tanıma dizisinde birkaç nükleotid değişimi varsa, farklı kaynaklardan alınan DNA, bazı restriksiyon enzimlerle kesildiğinde farklı uzunlukta DNA fragmentleri meydana gelir. Bu nedenle bu metod Restriksiyon Fragment uzunluk (Length) Polimorfizmi olarak adlandırılmaktadır. Tüm RFLP deneyleri, bir veya daha fazla restriksiyon enzim ile DNA’yı kesmeyi kapsar. Kesilen DNA parçaları direkt boyama veya otoradyografi kullanılarak jel elektroforezi aracılığıyla büyüklüklerine göre ayrılır. Küçük fragmentler büyük fragmentlere oranla jel elektroforezinde daha hızlı hareket eder. Jel üzerine yüklenecek olan baz uzunlukları bilinen bir standart ile kalibrasyon eğrisi yapılarak bilinmeyen DNA parçasının moleküler ağırlığı hesaplanabilir. Bireysel DNA’lar arasındaki farklılıkların (polimorfizm) kaynağı, bölgeye özgü enzimin tanıma bölgesi içinde meydana gelen baz substitüsyonları veya inversiyon, insersiyon ve delesyonlar gibi yeniden dizi düzenlemeleridir. Böyle değişiklikler her bir birey için karakteristik bir örneği meydana getirir ve bu

durum bireyler arasındaki genetik polimorfizmi değerlendirmemizde bize izin verir (98).

RFLP analizi ile bir enzimi kodlayan gen bölgesindeki allel polimorfizmi tespit edilerek homozigot ve heterozigot allellerin sıklığı hesaplanabilir.

3. GEREÇ VE YÖNTEM

3. 1. 1. Kullanılan Cihazlar

- Masaüstü Makro Santrifüj (Mistral 1000 MSE)
- Hassas Tartı (Denver Instrumen Company)
- Manyetik Karıştırıcı (BIBBY Stuart)
- Vorteks (Clifton Cyclone)
- PH Meter (Metle Toledo MP 2200)
- Mikrodalga fırını (BEKO MD 1500)
- Mikropipetler -10µl, 20µl, 200µl ve 1000µl- (Gilson)
- Fanlı Ekonomik İnkübatör (Gallenkamp)
- Thermal Cycler (Gen Amplifikasyon PCR sistem 9700 Applied Biosystems)
- Elektroforez Güç Kaynağı (EC 1000-90)
- Elektroforez Tankı (Whatman Biometra)
- Jel Görüntüleme (Vilber Lourmat Photodocumentation and Video Graphic Printer UP-895CE)
- UV Translimunator (UVP)

3. 1. 2. Kimyasal Maddeler

- Tris bazı (Sigma)
- Asetik asit (E-Merck)
- EDTA (Sigma)
- Sodyum Dodesil Sülfat (SDS)
- Proteinaz K (Fermentas)
- Amonyum Asetat (E-Merck)
- %96'lık Absolü Alkol (Riedel- de Haen)
- Primer sentezleri (Iontek)
- dNTP miks (Fermentas)
- MgCl₂ (Fermentas)
- PCR tamponu (Fermentas)
- *Taq* DNA Polimeraz (Fermentas)
- Rsa I Restriksiyon Endonükleaz (Fermentas)
- B⁺ tamponu (Fermentas)
- Agaroz (Sigma)
- Formamid (Sigma)
- Xylene Cyanol (Sigma)
- Bromfenol Blue (Bio Basic İnc.)
- Gene Ruler™ DNA Ladder Mix (Fermentas)
- Gene Ruler™ 50 bp DNA Ladder (Fermentas)

3. 2. Çalışma Grubu

Araştırmamızda, Sivas Cumhuriyet Üniversitesi Tıp Fakültesi Araştırma ve Uygulama Hastanesi Kadın Hastalıkları ve Doğum kliniğine başvuran, pre-eklampsi, eklampsi ve HELLP sendromu kesin tanısı konmuş 18.06.2002 tarih ve 11 sayılı yerel kurul kararı gereğince izin alınmış, primer olarak öyküsünde; karaciğer, böbrek, kardiovasküler veya hipertansiyon hastalığı olmayan 250 kadın, hasta grubu olarak değerlendirildi. Hastaların 150 kişilik grubunu pre-eklampsi, 60 kişilik grubunu HELLP sendromu ve 40 kişilik grubunu da eklampsi tanısı konmuş hastalar oluşturmaktadır.

Cumhuriyet Üniversitesi Tıp Fakültesi Kadın Hastalıkları ve Doğum Kliniği doktorları tarafından pre-eklampsi, eklampsi ve HELLP sendromu tanısı konulurken şu kriterler göz önünde tutulmuştur:

20. gebelik haftasından sonra altı saatlik aralarla ölçülen diastolik kan basıncının iki yada ikiden fazla ölçümde 90 mmHg'den (faz 5 Korotkoff sesi) yüksek olması ve 24 saatlik idrarda protein düzeyinin 0.3 g/L' den olması (konkordant proteinüri) pre-eklampsi olarak değerlendirilirken, bu tabloya tonik-klonik kasılmaların eklenmesi durumunda eklampsi olarak değerlendirilmiştir. HELLP sendromu ise ölçülen trombosit değerlerinin 1×10^{11} /L'den büyük ve periferik yaymada hemolizin varlığı tanı kriteri olarak kabul edilmiştir.

Kontrol grubu olarak; gebeliği iki ve üzerindeki döneme kadar devam etmiş olan, kendisinde veya ailesinde pre-eklampsi hikayesi olmayan, sigara kullanmayan, kronik hipertansiyon, diyabet ve spontan düşüğü olmayan, rastgele seçilmiş yaklaşık 150 normal kadın çalışmaya dahil edildi.

Çalışmamızda yer alan hasta grubunun ve kontrol grubunun klinik tanısı C.Ü. Tıp Fakültesi Kadın Hastalıkları ve Doğum kliniğinde konulmuştur.

3. 3. Örneklerin Alınması

Sivas Cumhuriyet Üniversitesi Tıp Fakültesi Araştırma ve Uygulama Hastanesi Kadın Hastalıkları ve Doğum kliniğine başvuran, pre-eklampsi, eklampsi ve HELLP sendromu kesin tanısı konan hasta ve kontrol grubunu oluşturan bireylere, Kadın Hastalıkları ve Doğum kliniği ilgili doktorları

tarafından yapılacak çalışma hakkında gereken açıklamalar yapılmış, izin belgesini imzalamaları sağlanmıştır. Özgeçmişleri hakkında gerekli bilgilerin bulunduğu formları doldurmaları sağlandıktan sonra, yaklaşık olarak 5 ml olacak şekilde venöz kandan alınan örnekler 15 ml'lik EDTA (etilen diamin tetra asetik asit) bulunan steril tüplere konularak C.Ü. Tıp Fakültesi Tıbbi Biyoloji Anabilim Dalına gönderilmiştir.

3. 4. DNA İzolasyonu

Anabilim Dalımızda bir proje kapsamında 200 hasta ve 100 kontrol grubunun DNA'ları daha önceden "***Yüksek Tuz Konsantrasyonuyla DNA İzolasyonu***" yöntemiyle izole edilmiştir. Geriye kalan örneklerden DNA elde edilmesi aynı yöntem kullanılarak yapılmıştır (99).

- Hasta ve kontrol gruplarından alınarak EDTA'lı steril tüplere konan 5 ml venöz kanın üzerine kanın üç katı oranında olacak şekilde (kan ve bidistile toplamı 15 ml olacak şekilde) steril edilmiş, soğuk bidistile su ilave edildi.
- Tüplerdeki kanın su ile karışmasını sağlamak için birkaç kez hızlı bir şekilde elle çalkalandı.
- 2200 rpm'de 10 dakika santrifüj edilerek kanın elemanlarının çökmesi sağlandı.
- Santrifüjden alınan tüplerin üzerinde oluşan süpernatant atılarak dipte kalan çökelti üzerine yine üç katı hacimde olacak şekilde bidistile su konularak aynı devir ve sürede santrifüj yapıldı.
- Bu işlem dört kez daha tekrarlandı.
- Son yapılan santrifüjden sonra alınan tüplerde üstte kalan süpernatant atılır, altta kalan çökelti içerisine hücre içeriğinin serbest kalabilmesi için hücre zarını yıkan 100 µl %10'luk SDS (sodyum dodesil sülfat), 30µl proteinaz K (10mg/ml) ve 1500 µl lysis tamponu ilave edildi ve bir gece boyunca 37°C'de etüvde bekletildi.
- Ertesi gün etüvden çıkarılan tüplere 1000 µl 10 M amonyum asetat eklenerek 3500 rpm'de 15 dakika santrifüj edildi.

- Üstte kalan süpernatant yeni bir tüpe dipte kalan çökelti karışmayacak şekilde aktarıldı.
- Tüpe alınan süpernatantın iki katı oranda olacak şekilde üzerine absolü alkol ilave edildi.
- Hafifçe ileri-geri çalkalandığında genomik DNA gözlemlendi. İnce bir pipet ucu yardımıyla sıvı içerisinde DNA alındı.
- Daha önce etiketlenen 1,5 ml'lik steril ependorf tüplere konan 250 µl TE tamponu içerisine, alınan DNA kondu. DNA'nın tampon içerisinde çözünmesi için bir gece oda ısısında bekletildi. Çalışmada kullanılincaya kadar -20 °C' de saklandı.

3.5. Genotipleme:

Mikrozomal epoksid hidrolaz gen polimorfizmi için *PCR-RFLP* (Polymerase Chain Reaction-Restriction Fragment Length Polymorphism) yöntemi kullanıldı.

PCR yönteminde Ekzon 4 amplifikasyonu için kullanılan primer dizileri

Forward (ileri) Primer: 5' GGG GTA CCA GAC CTG ACC GT 3'

Revers (geri) Primer: 5' AAC ACC GGG CCA CCC TTG GC 3'

Tablo 3. 5. 1. PCR koşulları

Solüsyonlar	Konsantrasyon	Miktar
PCR tamponu	1X	2.5 µl
dNTP karışımı	2 mM	2.5 µl
MgCl ₂	25 mM	1.5 µl
Forward primeri	10 pmol	1 µl
Reverse primeri	10 pmol	1 µl
<i>Taq</i> DNA polimeraz	5 U/µl	0.3 µl
dH ₂ O	-	15.2µl
DNA	50 ng/µl	1µl

Tablo 3.1’de gösterildiği oranlarda hazırlanan karışımdan 24µl alınarak 0.2 µl’lik etiketlenmiş ependorf tüplere paylaştırıldı. İzole edilmiş DNA örneklerinden 1µl alınarak bu karışımlara eklenerek, amplifikasyon işlemi için PCR cihazına yerleştirildi (toplam volüm: 25µl). Cihaz aşağıda belirtilen programa ayarlanarak PCR tepkimesi uygulandı.

Tablo 3. 5. 2. PCR Programı

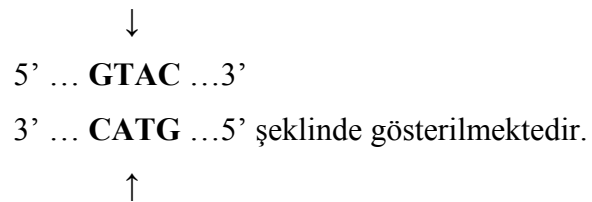
Ayrılma (Denatürasyon)	94 °C’de 5 dakika	1 döngü
Primerlerin bağlanması (Annaeling)	93 °C’de 1 dakika 67 °C’de 35 saniye 72 °C’de 45 saniye	30 döngü
Uzama (Extension)	72 °C’de 7 dakika	1 döngü

Tablo 3. 5. 3. RFLP koşulları

PCR amplifikasyon ürünü	8,5 µl
B ⁺ tampon solüsyonu	1 µl
Rsa I Restriksiyon Endonükleaz enzimi	0,5 µl

eklenerek hazırlanan karışım etiketlenmiş 0.2 ml’lil ependorf tüplere konularak 37 °C sıcaklıkta 2 saat bekletilerek DNA parçalarının kesilmesi sağlandı.

RsaI restiksiyon enziminin DNA üzerinde tanıma bölgesi;



3. 6. Jel Elektroforezi:

PCR ve RFLP sonrasında elde edilen ürünler %2 yoğunlukta agaroz jel elektroforezinde koşturuldu.

3. 6. 1. Jelin Hazırlanması:

100 ml'lik jel tankında %2 yoğunlukta agaroz jeli hazırlamak için 2 gr agaroz tartılarak 250 ml'lik erlenmayer içine kondu. Üzerine X10 yoğunlukta olan TBE tamponundan (Tris-HCL, Borik asit, EDTA) X1 (10 ml X10 yoğunlukta TBE tamponuna 90 ml bidistile su eklenerek hazırlanır) yoğunlukta hazırlanan 100 ml TBE tamponu kondu ve mikrodalga fırınında ısıtılarak berraklaşması sağlandı. Berraklaşan jelin el yakmayacak ısıya düşürülmesi için akan musluk altında soğutuldu. Jel içerisine 5 µl etidium bromür eklenerek boyanması sağlandı ve 100 ml'lik agaroz jel tankına döküldü. DNA yüklenecek kuyucuk oluşturmak için taraklar yerleştirildi ve jelin donması bekledi.

3. 6. 2. Jelde DNA'nın koşturulması

6 µl PCR ürününe 2 µl yükleme tamponu eklendi. Toplam 8 µl karışım kuyucuklara yüklendi. DNA fragmentlerinin baz çifti uzunluklarını karşılaştırmak için 50 bç (baz çifti) ve 100 bç'lik DNA belirteçleri kullanıldı. 2 µl alınan belirteç 1 µl distile su ve 1 µl yükleme tamponu ile karıştırılarak jele yüklendi. Yüklenen DNA'lar 100 voltta 30 dakika koşturuldu ve UV altında görüntüledi.

4. İSTATİSTİKSEL ANALİZ

Çalışmamızda gruplar arasında anne yaşı, parite ve gravida sayısı, gebelik haftası ve diastolik kan basıncı ortalamaları Varyans analizi ve Tukey Çoklu Karşılaştırma metoduna göre değerlendirildi. Hasta grubunda bulunan bireyler; diyabet öyküsü, daha önceki gebeliklerinde hastalık öyküsünün bulunması, eşi ile ve anne-babası ile akraba olma parametrelerine göre χ^2 testi kullanılarak değerlendirildi. İstatistiksel analiz, SPSS 12.0 bilgisayar programı kullanılarak yapıldı. Ayrıca risk oranları (OR:odds ratio) ve güvenlik aralıkları (CI: %95 confidence interval) χ^2 testi ve Fisher's exact testi kullanılarak tespit edildi (100).

χ^2 testi uygulamasında değerlendirmenin sağlıklı yapılabilmesi için, değerlendirme gözlerine düşen beklenen değer sayısının 5'den küçük olmaması gerekmektedir. Fakat çalışmamızda kaynak olarak gösterilen Jerrold H. Zar'a göre, toplam birey sayısı gözenek sayısına bölündüğünde, her bir göz için beklenen değerlerin ortalama sayısı 6 olursa χ^2 analizi yapılabilmektedir. Bulguların değerlendirilmesinde bu açıklama göz önünde tutulacaktır (101).

5. BULGULAR

Çalışmamızda pre-eklampsi (n=150 kadın), eklampsi (n=40 kadın), HELLP sendromu (n=60 kadın) tanısı konmuş toplam 250 kadın, hasta grubu olarak ve 150 sağlıklı kadın, kontrol grubu olarak incelemeye alındı.

Pre-eklampsi, eklampsi, HELLP sendromlu bireylerin oluşturduğu hasta grubu ile kontrol grubunda yer alan bireylerin yaş, parite, gravida, gebelik haftası ve diastolik kan basıncı (demografik ve klinik özellikler) ortalamaları varyans analizi ve Tukey HSD çoklu karşılaştırma yöntemi kullanılarak değerlendirilmiştir (Tablo 5.1).

Tablo 5. 1. Hasta ve Kontrol Grubunda Yer Alan Bireylerin Demografik ve Klinik Özellikleri

	Pre-eklampsi (n=150)	Eklampsi (n=40)	HELLP sendromu (n=60)	Kontrol (n=150)
Yaş (y)	29 ± 7 (17-48)	24 ± 6 (16-40)	29 ± 7 (17-45)	29 ± 4 (21-36)
Parite	2.3 ± 2.1 (0-11)	1.1 ± 1.2 (0-5)	2.0 ± 1.8 (0-8)	2.4 ± 0.6 (2-5)
Gravida	3.4 ± 2.6 (1-13)	1.9 ± 1.4 (1-7)	3.5 ± 2.3 (1-12)	2.8 ± 1 (2-7)
Gebelik haftası	34 ± 4 (24-42)	33 ± 4 (26-41)	33 ± 4 (20-41)	---
Kan Basıncı (mmHg)	104 ± 10 (90-140)	106 ± 10 (90-130)	106 ± 13 (90-140)	---

(* ± SD: Standart Sapma)

Bu değerlendirmeye göre, eklampsi grubundaki bireylerin yaş ortalamasının diğer gruplara oranla daha düşük olduğu bulunmuştur ve gruplar arasındaki bu farkın anlamlı olduğu gösterilmiştir (Varyans: F: 7.730, P<0,001).

Doğum sayısı (Parite) ve gebelik sayısı (Gravida) ortalamaları açısından gruplar değerlendirildiğinde, eklampsi grubu ile diğer gruplar (pre-eklampsi, HELLP sendromu ve kontrol grubu) arasında fark olduğu bulundu (parite için Varyans: F: 7.157, P<0.001 ve gravida için Varyans: F:6.671, P<0.001).

Gebelik haftası açısından hasta grupları kendi aralarında karşılaştırıldığında, gebelik haftası ortalamalarının benzer olduğu grlmştur (Varyans: F: 3.836, P>0.05).

Diğer bir değerlendirme, diastolik kan basıncı ölçümlerine göre yapıldı. Kontrol grubunu oluşturan bireylerin diastolik kan basınçları normal sınırlar içerisinde (90 mmHg ve alt değerleri) olduğundan değerlendirmeye sadece hasta grubu alındı. Değerlendirme sonucunda hasta gruplarında yer alan bireylerin diastolik kan basıncı ortalamaları karşılaştırıldığında, hasta grupları arasında anlamlı bir farka rastlanmamıştır (Varyans analizi: F: 1.569, P>0.05).

Pre-eklampsi, eklampsi, HELLP sendromu gruplarında yer alan bireyler diyabet öyküsü olanlar ve olmayanlar açısından değerlendirildiğinde, pre-eklampsi grubunda, 150 bireyden sadece 2 kişide (%1.3), HELLP sendromu grubunda 60 kadından sadece 1 kadında (%1.7) diyabet öyküsü olduğu belirlenmiştir. Eklampsi grubunda yer alan bireylerin hiçbirinde diyabet öyküsü tespit edilememiştir. χ^2 testine göre yapılan karşılaştırmada, gruplar arasında bir fark bulunamamıştır (χ^2 : 1.851, P>0.05).

Pre-eklampsi grubunda 150 bireyin 30'unda (%20), eklampsi grubunda 40 hastanın 4'ünde (%10) ve HELLP sendromu grubunda 60 hastanın 9'unda (%15) nceki gebeliklerinde hastalık öyküsü olduğu belirlenmiştir. χ^2 testine göre, gruplar arasında bir fark bulunamadı (χ^2 : 2.486, P>0.05).

Hasta grubunu oluşturan bireylerin eşleri ile akraba olmalarının gruplara göre dağılımı değerlendirildiğinde, 150 pre-eklamptik hastadan 25'inde (%16.7) akrabalık tespit edilirken 125 bireyin (%83.3) eşleri ile akrabalığı yoktur. Eklampsi grubunda bulunan bireylerin 36'sında (%90) bu akrabalık yokken 4

birey (%10) eşi ile akrabadır. HELLP sendromu grubunda ise 52 bireyde (%86.7) akrabalık yokken 8 bireyde (%13.3) akrabalık vardır. Değerlendirme sonucunda, HELLP sendromu ve pre-eklampsi grubunda bulunan kadınların eklampsi grubundaki kadınlara oranla eşleri ile akraba olma oranının birbirine yakın değerlerde olduğu gözlemlendi. Gruplar arasında yapılan değerlendirme sonucunda ise bir fark bulunamadı (χ^2 : 1.248, $P>0.05$).

Ayrıca hasta grubunun anne-babalarının akraba olma durumuna göre dağılımları da incelenmiştir. Pre-eklampsi grubunda 150 bireyden 28 'inin (%18.7, eklampsi grubunda 40 kadından 6 bireyde (%15), HELLP sendromu grubunda ise, 60 bireyden sadece 6 bireyde (%10) anne-baba akrabalığı vardır. χ^2 testine göre, anne-baba akrabalığının gruplar arasında düşük oranda olduğu ve gruplar arasında bir fark bulunmadığı belirlendi (χ^2 : 2.431, $P>0.05$).

Mikrozomal epoksid hidrolaz (EPHX) geni 4. ekzonunun, 139. kodonunda Histidin Arjinine dönüşmesiyle meydana gelen polimorfizmin pre-eklampsi, eklampsi ve HELLP sendromu hasta gruplarında dağılımı Tablo 5. 2' de gösterilmektedir.

Mikrozomal epoksid hidrolaz geni ekzon-4 bölgesinde 139 Histidin amino asitini kodlayan CAC dizisinde (doğal tip) ikinci sırada yer alan Adenin bazının (A) yerini Guanin bazı (G) alması sonucunda 139 Arginin (CGC) amino asiti kodlanarak RsaI restriksiyon enziminin tanıma bölgesi oluşur. Bu enzime maruz kalan 295 bç ve 62 bç uzunluğundaki iki DNA fragmenti 174 bç, 121 bç ve 62 bç uzunluğunda üç fragmente ayrılır. Agaroz jel elektroforezinde 139His-139His homozigot alleli taşıyan bireylerde 295bç ve 62bç uzunluğunda iki bant gözlenirken, 139His-139Arg heterozigot alleli taşıyan bireylerde 295 bç, 174 bç, 121 bç ve 62 bç uzunluğunda 4 bant gözlenmektedir. 139Arg-139Arg homozigot allelini taşıyan bireylerde de 174 bç, 121 bç ve 62 bç uzunluğunda 3 bant gözlenmektedir (Şekil 5.1).

Tablo 5. 2. EPHX Geninin Ekzon-4 Bölgesinde Polimorfik Allel Dağılımı

Gen	Alleller	Pre-eklampsi (n=150)	Eklampsi (n=40)	HELLP sendromu (n=60)	Kontrol (n=150)
Ekzon-4	AA(His139His139)	95 %63.3	21 %52.5	43 %71.7	113 %75
	AG(His139Arg139)	48 %32.0	18 %45.0	16 %26.7	35 %23
	GG(Arg139Arg139)	7 %4.7	1 %2.5	1 %1.7	2 %1.3

Hasta grupları kendi aralarında polimorfik allel dağılımı yönünden karşılaştırıldığında fark bulunamazken (χ^2 : 12.274, $P>0.05$), toplam hasta grubu kontrol grubu ile karşılaştırıldığında fark bulunmuştur (χ^2 : 6.522, $P<0.05$).

Pre-eklampsi, eklampsi, HELLP sendromu grupları kontrol grubu ile ayrı ayrı karşılaştırıldığında ise, pre-eklampsi-kontrol grubu (χ^2 : 6.372, $P<0.05$) ve eklampsi-kontrol grubu arasında allel dağılımı fark gösterirken (χ^2 : 7.921, $P<0.05$), HELLP sendromu-kontrol grubu arasındaki karşılaştırmada polimorfik allel dağılımı yönünden bir fark bulunamamıştır (χ^2 : 0.307, $P>0.05$).

Pre-eklampsi, eklampsi ve HELLP sendromunun yer aldığı hasta grubunda EPHX geninin 4. ekzonunda meydana gelen polimorfizmin kontrol grubuna göre bir risk oluşturup oluşturamadığı χ^2 ve Fisher's exact testine göre değerlendirilmiştir.

Gruplar ayrı ayrı değerlendirildiğinde elde edilen sonuçlar Tablo 5. 3'de gösterilmektedir.

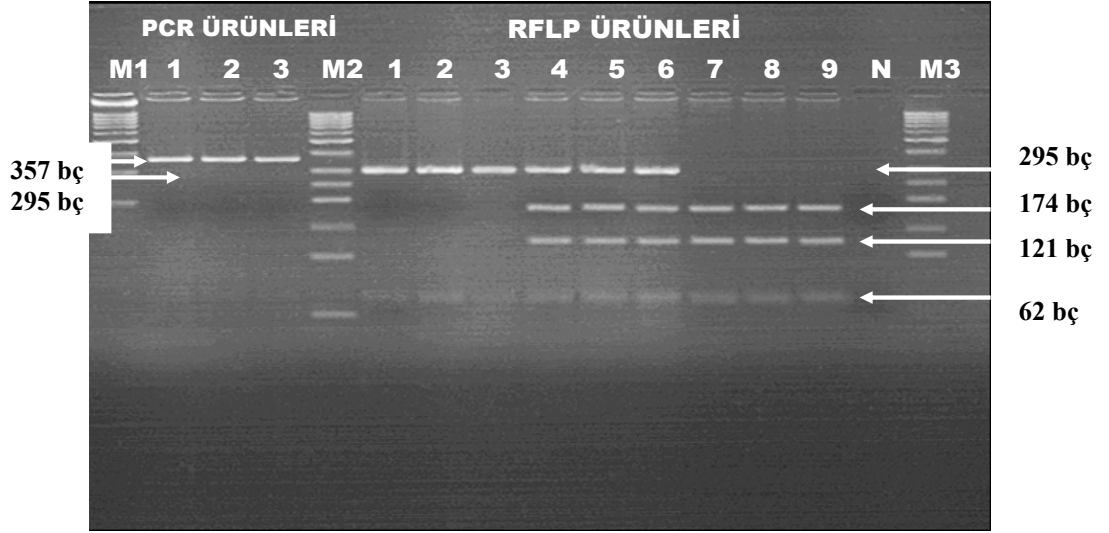
Tablo 5. 3. Hastalığın Ortaya Çıkmasında Hasta Gruplarının Kontrol Grubuna Göre Taşıdığı Risk Oranları

Gen Ekzon-4	Pre-eklampsi (n=150)	Eklampsi (n=40)	HELLP sendromu (n=60)	Toplam (n=250)
P değeri	0.09	0.59	0.85	0.18
OR (%95CI)	3.6 (0.74-17.73)	1.89 (0.16-21.47)	1.25 (0.11-14.09)	2.7 (0.58-12.96)

İstatistiksel değerlendirme sonucunda, 139Arg/Arg alleleline sahip bireylerin olmayanlara (139His/His ve 139 His/Arg) göre hastalığın meydana gelme riskinin, 2.7 kat daha fazla olduğu tespit edilmiştir, fakat bu oran p değerine göre anlamlı değildir (χ^2 : 1.801, $P>0.05$) (%95 CI: 0.58-12.96).

Tabloda görüldüğü gibi, pre-eklampsi grubunda bulunan bireylerde sendromun görülme riski diğer gruplara oranla çok daha yüksektir. Fakat bu sonuç P değerleri dikkate alındığında anlamlı değildir

Şekil 5. 1. Hasta gruplarının DNA'larından PCR yöntemi ile amplifiye edilen EPHX geninin ekzon-4 bölgesinin RFLP yöntemi ile yapılan genotiplenmesi.



- 357 bç uzunluğunda gözlenen fragmentler: 1, 2, 3 nolu hastaların PCR ürünleri
- 295 bç ve 62 bç uzunluğunda gözlenen fragmentler: (139His/139His Homozigot doğal tip) 1, 2, 3 nolu hastaların RFLP ürünleri
- 295 bç, 174 bç, 121 bç ve 62 bç uzunluğunda gözlenen fragmentler: (139His/139Arg Heterozigot tip) 4, 5, 6 nolu hastaların RFLP ürünleri
- 174 bç, 121 bç ve 62 bç uzunluğunda gözlenen fragmentler: (Homozigot polimorfik tip 139Arg/139Arg) 7, 8, 9 nolu hastaların RFLP ürünleri
- 10 nolu kuyucuk: Negatif kontrol,
- M1: Gene Ruler™ DNA Ladder Mix (Belirteç)
- M2 ve M3: Gene Ruler™ 50 bp DNA Ladder (Belirteç)

6. TARTIŞMA ve SONUÇ

Çağdaş dünya insanlığa kolay ve rahat bir yaşam sunarken beraberinde, sağlığı tehdit eden çeşitli zararlı bileşenleri de üretmektedir. Hava, su, besin, sigara vb. ile organizma içerisine alınan bu bileşenler önemli bazı enzimler tarafından zararsız formlara dönüştürülmektedirler. Biyotransformasyon enzimleri olarak adlandırılan bu enzimlerin yapısında yada aktivitesinde meydana gelebilecek değişiklikler detoksifikasyon işlemlerinde aksaklıklara neden olmaktadır. Bu aksaklıklar zararlı ara ürünlerin vücutta birikmesine ve sonuçta organizmanın toksik etkilere maruz kalmasına neden olmaktadır. Biyotransformasyon enzimlerinde aktivite değişikliklerine neden olan unsurlardan biri de, bu enzimleri kodlayan genlerin sahip olduğu polimorfizmlerdir. Polimorfizmler, bireyler arası farklılıklardan, çevresel faktörlerden veya bireylerin yaşam biçimlerine bağlı olarak meydana gelebilmektedir. Biyotransformasyon enzimlerini kodlayan genlerin sahip oldukları polimorfizmlerin bir çok hastalığın etiolojisinde güçlü birer etken olabileceği düşünülmüştür (6, 7).

mEH, önemli bir biyotransformasyon faz I enzimidir. Bu enzimi kodlayan EPHX geninin 3. ve 4. ekzonlarında meydana gelen Tyr113His ve His139Arg polimorfizmlerinin çeşitli kanser türlerine, bazı akciğer hastalıklarına, kalp-damar hastalıklarına ve pre-eklampsi, eklampsi, HELLP sendromu gibi bazı hastalıklara karşı koruyuculuk yada hastalıklara yatkınlık oluşturduğu bildirilmiştir (71, 94).

Çalışmamızda, EPHX geni ekzon-4 139His/Arg polimorfizminin kadınlarda pre-eklampsi, eklampsi ve HELLP sendromu gelişmesinde bir risk faktörü oluşturup oluşturmadığı değerlendirilmiştir. Anne ve fetüs sağlığı için büyük bir tehdit oluşturan bu sendromlar için genetik kökenin olup olmadığı sorusunu kesin olarak yanıtlayabilecek bu tür çalışmalar, çözüme yönelik çalışmaların da hız kazanmasına neden olacaktır. Ayrıca ailesel yatkınlığın anlaşılması, risk faktörlerinin belirlenmesi, genetik danışmanlık adına etkin eğitim verilmesini de sağlaması açısından önem taşımaktadır.

Pre-eklampsi, eklampsi, HELLP sendromunun ortaya çıkmasında bazı risk faktörleri ileri sürülmektedir. Bu risk faktörlerinden biri de genç anne yaşıdır (20). İngiltere’de 1992-2001 yılları arasında yapılan bir hasta-kontrol çalışmasında,

pre-eklampsisi insidansının üreme yaşı sınırında (<20 yaş ve >40 yaş) bulunan doğum yapmamış bayanlarda daha yüksek olduğu, ayrıca bu hastaların kontrol grubuna göre prematüre doğum oranının da daha yüksek olduğu belirlenmiştir (102). Brajenari-Mili ve arkadaşlarının yaptığı bir başka çalışmada, pre-eklampitik hastaların yaş ortalamasını 27.9 ± 4.3 , kontrol grubunun yaş ortalamasını ise 30.6 ± 5.1 olarak bulmuşlardır (103). Türkiye’de Yüzüncü Yıl Üniversitesi’nde 1997-2000 yılları arasında yapılan çalışmada ise, 130 ağır pre-eklampsisi, eklampsisi tanısı konmuş hasta ile 30 HELLP sendromu tanısı konmuş kadından oluşan iki grubun yaş ortalamaları karşılaştırıldığında, HELLP sendromlu hastaların daha yüksek yaş ortalamasına sahip olduğu tespit edilmiştir (pre-eklampsisi ve eklampsisi hastaları: 29.53 ve HELLP sendromu hataları: 32.61). Tespit edilen bu farklılığın istatistiksel olarak anlamlı olduğu gösterilmiştir ($P=0.045$) (104). Bizim çalışmamızda, hasta grubunun (pre-eklampsisi, eklampsisi, HELLP sendromu) yaş ortalaması 28.49 ± 7.170 (16-48 yaş) ve kontrol grubunun yaş ortalaması ise 29.63 ± 4.507 olarak saptanmıştır. Bu iki grubun yaş ortalamaları karşılaştırıldığında anlamlı bir farka rastlanmazken, grupların kendi aralarında karşılaştırılması sonucunda, eklampsisi grubunun yaş ortalamasının (24.53 ± 6.329) diğer gruplara oranla anlamlı olarak daha düşük olduğu tespit edilmiştir ($p<0.05$). Diğer çalışmalarla karşılaştırdığımızda, elde edilen genel sonuçlar uyumlu bulunmazken, eklampsisi grubu değerlerinin uyumlu olduğu gösterilmiştir.

Hasta ve kontrol gruplarının parite ve gravida sayıları değerlendirildiğinde, eklampsisi grubunda yer alan bireylerin diğer gruplara oranla daha az sayıda parite ve gravidaya sahip olduğu belirlenmiştir. Parite değerlendirme aralıkları dikkate alındığında (pre-eklampsisi 0-11, eklampsisi 0-5, HELLP sendromu 0-8 ve kontrol grubu 2-5) bu farklılığın çok anlamlı olmadığı görülmektedir. Ayrıca gravida değerlendirme aralıklarında benzer anlamı taşımaktadır (pre-eklampsisi 1-13, eklampsisi 1-7, HELLP sendromu 1-12 ve kontrol grubu 2-7). Gebelik haftası açısından hasta grupları kendi aralarında değerlendirildiğinde de sonuçlar benzer bulunmuştur. Bu kriterlerin ilgili hastalık için risk faktörü olabileceğini gösteren bir kaynağa ulaşamadık.

Bu sendromların ortaya çıkmasında bazı hastalıklarında etken olabileceği düşünülmektedir. Diyabetes Mellitus (DM) ve hipertansiyon bu hastalıklardan en belirgin olanlarıdır. Yapılan bazı çalışmalarda, problemin kalbi olan plasentanın, kütlesinin DM olan kadınlarda arttığı tespit edilmiştir. Ayrıca bu çalışmalarda daha önce varolan DM öyküsünün, pre-eklampsi gelişimi için bir risk faktörü olduğuda bildirilmektedir (105). Qiu ve arkadaşlarının yaptığı bir çalışmada, ebeveynlerde tip 2 diabet öyküsünün bulunması pre-eklampsi riskini 2 kat artırdığı ifade edilmektedir. Annede yada sadece babada DM öyküsünün olması bu risk oranını fazla değiştirmemekte buna karşın, diyabetik bir kız kardeşe sahip olan kadınlarda bu oranın 4.7 kat artırdığı bildirilmektedir (106). 1992-1998 yılları arasında yapılan hasta-kontrol çalışmasında Bryson ve arkadaşları, gestasyonel diabetin, hafif-ağır pre-eklampsili, eklampsili ve gestasyonel hipertansiyonu olan hastalarda (eklampsi hastalarında %3.9, ağır pre-eklampsi hastalarında %4.5, hafif pre-eklampsili hastalarda %4.4) kontrol grubuna oranla daha yaygın görüldüğünü bildirmektedirler. Bizim pre-eklampsi grubumuzda 2, HELLP sendromu grubunda sadece 1 hastada DM öyküsü vardır. Eklampsi grubunda ise DM öyküsü olan hastaya rastlanmamıştır. Eldeki verilerimiz diğer çalışmaların verileriyle uyumlu değildir (106, 107).

Diğer önemli risk faktörü hipertansiyondur. Çalışmamızda hipertansiyon tanısı için diastolik kan basıncı değerleri alınmıştır. Kontrol grubunda bulunan bireylerin tansiyon değerleri normal sınırlarda olduğundan sadece hasta grubundaki bireylerin diastolik kan basıncı değerleri incelenmiştir. Üç grupta (pre-eklampsi, eklampsi, HELLP sendromu) yer alan hastaların diastolik kan basıncı ortalamaları 105.40 ± 17.018 mmHg (90-140 mmHg) olarak belirlenmiştir. Sibai ve arkadaşlarının birçok kriterle birlikte kan basıncı ölçümlerini değerlendirdiği çalışmalarında, >61 mmHg diastolik kan basıncının istatistiksel olarak pre-eklampsiye hazırlayıcı bir etmen olacağı ifade edilmektedir (108).

Önceki gebeliklerde hastalık öyküsü olmasının sonraki gebeliklerde risk oranını artırabildiği ve pre-eklampsi, eklampsi, HELLP sendromuna ailesel bir

yatkınlık oluşturabilme riski değerlendirildiğinde; Norveç'te yapılan hasta-kontrol çalışmasında, hastalık öyküsü olan bir kadın ve eşinin çocuğunda, hastalık öyküsü olmayan bir eşle olan çocuğa oranla hastalığın ortaya çıkma riskinin iki kat daha fazla olduğu tespit edilmiştir. Ayrıca Esplin ve arkadaşları pre-eklampsi öyküsü olan kadınların torunlarında hastalığın ortaya çıkma olasılığının, hastalık öyküsü olmayanlara oranla 2 kat daha yüksek olduğunu bildirmişlerdir (105). 1996-1997 yılları arasında Ternöv'de yapılan populasyon temelli bir çalışmada, probandin kızkardeşlerinde pre-eklampsi gelişme riski, taşra populasyonunda ilk doğumunu yapanlara oranla 3.7 kat olarak belirlenmiştir. Ayrıca bu çalışmada incelenen annelerin, ilk doğumlarının 40'ından 9'unda pre-eklampsi gelişmiştir. HELLP sendromu gelişmiş probandların annelerinin ilk doğumlarının 14 tanesinin 6'sında pre-eklampsi gelişmiştir (109). Utah'da 1947-1959 yıllarında yapılan bir başka çalışmada, pre-eklamptik annelerin çocuklarında kontrol grubuna göre hastalığın görülme oranının daha yüksek olduğu bildirilmiştir. Başka bir çalışmada da, pre-eklampsi ve eklampsi insidansının pre-eklampsisi olan kadınların kızlarında %2.5 iken üvey kızlarında %1 olduğu tespit edilmiştir (110). Bu çalışmaların dışında Chesley ve arkadaşlarının yaptığı başka bir çalışmada, ailesel pre-eklampsi öyküsü risk faktörü olarak gösterilmemiştir. Çalışmamızda nceki gebeliklerinde hastalık öyküsü yönünden hasta grupları karşılaştırıldığında benzer sonuçlar elde edilmiştir. Ayrıca hasta grupları ailesel pre-eklampsi öyküsü yönünden değerlendirildiğinde de, eklampsi grubunda aile öyküsü tespit edilmezken pre-eklampsi ve HELLP sendromu gruplarında benzer oranlar bulunmuştur ve hasta grupları arasında ailesel yatkınlık yönünden fark görülmemiştir. Sonuç olarak, çalışma bulgularımız açıklanan diğer çalışmalarla uyumlu bulunmazken Chesley ve arkadaşlarının yaptığı çalışma ile uyumlu bulunmuştur (111).

Çalışmamızın yapılma amacı, bir biyotransformasyon faz I enzimi olan, mEH enzimini kodlayan EPHX geninin ekzon-4 139His→Arg polimorfizminin, pre-eklampsi, eklampsi ve HELLP sendromu gelişmesinde risk faktörü olup olmadığını belirlemektir. İncelediğimiz polimorfizmin enzim aktivitesini artırdığı bildirilmektedir. Enzim aktivitesinde meydana gelen değişiklikler, toksik metabolitlerin birikmesine, bunun sonucunda bu sendromların fizyopatolojisinde

yer alan oksidatif stres ve beraberinde endotelial hücre hasarının geliştiği sorunları ortaya çıkardığı düşünülmektedir. Çalışma sonucunda polimorfik allel dağılımının hasta grubunda kontrol grubuna göre anlamlı bir fark gösterdiği tespit edilmiştir. Gruplar, polimorfik allel dağılımı yönünden ayrı ayrı değerlendirildiğinde ise, pre-eklampsi ve eklampsi grubunun kontrol grubuna göre anlamlı olarak farklı olduğu, fakat bu farkın HELLP sendromu olan hastalar arasında bulunmadığı belirlenmiştir. “Finli ve Hallondalı” pre-eklamptik kadınlar arasında yapılan iki çalışmada da pre-eklampsi, eklampsi, HELLP sendromunun gelişmesinde EPHX polimorfizmlerinin bir risk faktörü olup olmadığı değerlendirilmiş ve ekzon-4 polimorfizmi ve hastalık ilişkisi anlamlı bulunmamıştır. Bizim çalışmamızda, EPHX geni ekzon-4 139His→139Arg polimorfizmi nispi risk oranları hasta ve kontrol grupları arasında karşılaştırıldığında, elde edilen sonuçların anlamlı olmadığı tespit edilmiştir. Sonuç olarak, pre-eklampsi, eklampsi ve HELLP sendromu ile ekzon-4 polimorfizmi arasında anlamlı bir birliktelik bulunmadığı sonucuna varılmıştır (10, 11).

Hasta grubunun genişletilmesinin ve çalışma grubunun EPHX geni ekzon-3 113Tyr/113His polimorfizmi yönünden de değerlendirilmesinin, çalışmayı daha anlamlı kılacağı düşünülmektedir.

ÖZET

PRE-EKLAMPSİ, EKLAMPSİ VE HELLP SENDROMU RİSKİ, İNSAN MİKROZOMAL EPOKSİD HİDROLAZ GENİ EKZON-4 POLİMORFİZMİNİN ARAŞTIRILMASI

Çalışmamızda mikrozomal epoksid hidrolaz (EPHX) geni ekzon-4 139 His→139Arg polimorfizminin pre-eklampsi, eklampsi ve HELLP sendromunun gelişmesinde risk oluşturup oluşturmadığını araştırmak amacıyla, 150 pre-eklampsi, 40 eklampsi, 60 HELLP sendromu tanısı konmuş ve 150 kontrol grubundan oluşan toplam 400 birey incelenmiştir.

PCR ve RFLP yöntemleri (Polymerase Chain Reaction ve Restriction Fragment Length Polymorphism) kullanılarak genotipleme çalışması, hasta ve kontrol gruplarından alınan kan örneklerinden izole edilen DNA'lar üzerinde yapılmıştır.

Agaroz jel elektroforezinde, PCR ürünü, 357 bç uzunlukta bir DNA fragmenti olarak izlenmiştir. RFLP sonrasında oluşan ürünler ise; 139His/His genotipi (295 bç ve 62 bç uzunluklarında iki fragment) homozigot doğal tip, 139His/Arg genotipi (295 bç, 174 bç, 121 bç ve 62 bç uzunluklarında 4 fragment) heterozigot, 139Arg/Arg genotipi (174 bç, 121 bç ve 62 bç uzunluklarında 3 fragment) homozigot olarak değerlendirilmiştir.

Çalışmamızda, parite, gravida, ortalama anne yaşı, gebelik haftası, diastolik kan basıncı, diyabet öyküsü, anne-baba ve eşiyle akrabalığı, önceki gebeliklerinde hastalık öyküsünün olması parametreleri ve genotip sıklıkları χ^2 testi ve varyans analizi (post hoc Tukey testi ile birlikte) kullanılarak, hasta ve kontrol grupları arasında (bazı parametreler sadece hasta grupları arasında) karşılaştırılmıştır. Hastalığın nispi risk oranları (OR-Odds Ratio) gibi olasılıklar %95 güvenlik aralığında (CI) değerlendirilmiştir. Elde edilen sonuçların bazıları anlamlı bulunurken bazılarında anlamlı bir ilişki tespit edilememiştir.

χ^2 analizi ile yapılan istatistiksel değerlendirmede, mikrozomal epoksid hidrolaz geni (EPHX) ekzon-4 polimorfizmi dağılımının hasta ve kontrol grubu

arasında anlamlı olarak farklı olduğu görülmüştür (χ^2 : 6,522 P<0,05). Ayrıca 139Arg/Arg genotipine sahip bireylerin olmayanlara (139His/His ve 139His/Arg) göre hastalığın meydana gelme riskinin, 2.7 kat daha fazla olduğu tespit edilmiş, fakat bu oranın P değeri dikkate alındığında anlamlı olmadığı belirlenmiştir (χ^2 : 1.801, P>0.05, %95 CI: 0.58-12.96).

Çalışmamızda, pre-eklampsi, eklampsi ve HELLP sendromu ile ekzon-4 polimorfizmi arasında anlamlı bir birliktelik bulunmadığı sonucuna varılmıştır. Hasta grubunun genişletilmesinin ve çalışma grubunun EPHX geni ekzon-3 polimorfizmi yönünden de değerlendirilmesinin, çalışmayı daha anlamlı kılacağı düşünülmektedir.

SUMMARY

INVESTIGATION OF HUMAN MICROSOMAL EPOXIDE HYDROLASE GENE (EPHX) EXON-4 POLYMORPHISM AND RISK OF PRE-ECLAMPSIA, ECLAMPSIA AND HELLP SYNDROME

The objective of this study is whether the exon-4 139His→139Arg polymorphism of microsomal epoxide hydrolase gene is a risk factor for pre-eclampsia, eclampsia and HELLP syndrome in total 400 individuals who are admitted to the Department of Gynecology and Obstetrics of Cumhuriyet University Hospital with a clinical presentation of pre-eclampsia (n=150), eclampsia (n=40), HELLP syndrome (n=60) and controls (n=150).

Genotyping studies have been performed by PCR and RFLP methods using DNA isolated from blood samples.

PCR product has been observed as a 357 bp DNA fragment. Three types of band patterns have been detected namely, homozygot wild type (139His/139His genotype; 295 bp and 62 bp), heterozygot type (139His/139Arg genotype; 295 bp, 174 bp, 121 bp and 62 bp) and homozygot polymorphic type (139Arg/139Arg genotype; 174 bp, 121 bp and 62 bp).

In this study, mean age, parity and gravidity and gestational age, diastolic blood pressure, Diabetes Mellitus, consanguineous marriage, parental consanguinity and pre-eclampsia history in previous pregnancy were compared by one-way ANOVA analysis with post hoc Tukey test, and χ^2 test. Statistical analyses were conducted using χ^2 test for the evaluation of variations of the genotype frequencies among the patient groups, between the case and control groups. Odds ratios (ORs) as estimates of relative risk of the disease were calculated on the basis of 95% confidence intervals (CIs). The relationships among the patient and between the case and control groups were found statistically significant in some parameters, particularly mean age, diastolic blood pressure. The distribution of polymorphic genotypes for exon-4 polymorphism of EPHX gene between case and control groups was evaluated statistically significant (χ^2 : 6.522, P<0.05). It

has been detected that OR has increased 2.7 fold in individuals with 139Arg/139Arg genotype versus individuals with 139His/139His and 139His/139Arg genotypes, but the range was not significant (χ^2 : 1.801, $P>0.05$, 95% CI:0.58-12.96).

In conclusion, the exon-4 polymorphic variations of EPHX gene studied were found not to correlate with pre-eclampsia, eclampsia and HELLP syndrome. It would be complementary to extend the polymorphism analysis to exon-3 polymorphism of EPHX gene in the study groups.

7. KAYNAKLAR

1. Sibai B.M., Usta I.M.: Chronic Hypertension in Pregnancy. In: Sciarra J.J., ed. Gynecology and Obstetrics. Philadelphia: Lippicott, 1995.
2. Roberts J.M., Cooper D.W. Pathogenesis and Genetics of Pre-eclampsia. *Lancet* 357: 53-56, 2001.
3. Sibai B. M. Eclampsia VI. Maternal-Perinatal Outcome in 254 Consecutive Cases. *Am. J. Obstet Gynecol* 163: 1045, 1990.
4. Merviel P., Carbillon L., Challier J-C., Rabreau M., Beaufils M., Uzan S. Pathophysiology of Pre-eclampsia: Links with Implantation Disorders. *Europ. J.of Obst. & Gyn. and Rep. Bio.* 115:134-147, 2004.
5. Yamaç K., Gürsoy R., Çakır N. Gebelik ve Sistemik Hastalıklar. M.N Medikal & Nobel. ISBN 975-567-019X, 2002.
6. Wormhoudt L.W., Commandeur J.N.M., Vermrulen N.P.E. Genetic Polimprhisms of Human N-Acetyltransferase, Cytochrome P450, Glutathione-S-transferse and Epoxide Hydrolase Enzymes: Relevance to Xenobiotic metabolism and Toxicity. *Critical Reviews in Toxicology.* 29 (1): 59-124, 1999.
7. Data base. <http://www.nvog.nl/files/Zusterzeel.pdf>. Zusterzeel P.L.M. Biotransformation Enzymes and Oxidative stres in Pre-eclampsia. 5 June 2001.
8. Seidegard J.and Ekström G. The Role of Human Glutathione Transferases and Epoxide Hydrolase in the Metabolism of Xenobiotics. *Environ. Health Perspect.* 105:791-799, 1997.
9. Hassett C., Aicher L., S. Sidhu J., J. Omiecinski C. Human Microsomal Epoxide Hydrolase: Genetic Polymorphism and Functional Expression in vitro of Amino Acid Variants. *Human Molecular Genetics*, Vol.3, No.3, 421-428, 1994.
10. Zusterzeel P. L. M., Peters W. H. M., Visser W., Hermsen K. J. M., Roelofs H. M. J., Steegers E. A. P. J. A polymorphism in the gene for microsomal epoxide hydrolase is associated with pre-eclampsia. *Med. Genet*; 38: 224-237, 2001.

11. Laasanen J., Romppanen E., Hiltunen M., Helisalml S., Mannermaa A., Punnonen K. Two Exonic Single Nucleotide Polymorphisms in the Microsomal Epoxide Hydrolase Gene are Jointly Associated with Pre-eclampsia. *European Journal of Human Genetics* 10, 569-573, 2002.
12. Ökten F., Şen S., Gebelikte Hipertansif Hastalıklar, Pre-eklampsisi, Eklampsisi, HELLP Sendromunda Obstetrik Anestezi. Ankara N. Vers. Tes. Tıp Fakültesi Mecmuası, Cilt: 55, Sayı: 1, 2002.
13. Diagnosis and Management of Preeclampsia and Eclampsia. *ACOG Practice Bulletin* 1. 99 (1): 159-66, 2002.
14. Demirkan O. Yoğun Bakımda Maternal Mortalite ve Morbidite. İ. Ü. Cerrahpaşa Tıp Eğitimi Etkinlikleri Maternal Mortalite ve Morbidite Sempozyumu, İstanbul, Sayfa: 89-112, 23.06.1999.
15. Data base. [http:// www.fdg.unimaas.nl/hellp/introduction.html](http://www.fdg.unimaas.nl/hellp/introduction.html).
16. Weinstein L., Syndrome of Hemolysis, Elevated Liver Enzymes and Low Platelet Count: A Severe Consequence of Hypertension in Pregnancy. *Am. J. Obstet Gynecol* 142: 159-67; 1982.
17. Lindheimer M.D., Roberts J.M., Cunningham F.G., Chesley L. Chesley's Hypertensive Disorders in Pregnancy, 2nd ed, Appleton & Lange. Connecticut, 1998.
18. Lachmeijer Augusta M.A., Dekker Guustaaf A., Pals G., Aarnoudse J.G., P. ten Kate L., Arngrimsson R. Searching for Pre-eclampsia Genes: The Current Position. *European Journal of Obstetrics & Gynecology and Reproductive Biology*. 105: 94-113, 2002.
19. Knopp U., Kehler U., Rickmann H., Arnold H., Gliemroth J. Cerebral Haemodynamic Pathologies in HELLP Syndrome, *Clinical Neurosurgery* 105: 256-261, 2003.
20. Lew M., Klonis E. Emergency Management of Eclampsia and Severe Pre-eclampsia. *Emergency Medicine* 15, 361-368, 2003.
21. Davies AM. Geographical Epidemiology of Toxemias of Pregnancy-Israel: Charles C Thomas, 1971.

22. Francis Badria L., Amarin Z.O. Does Consanguinity Affect The Severity of Pre-eclampsia? *Arch Gynecol Obstet.* 268: 117-120, 2003.
23. Redman C.W., Sacks G.P., Sargent I.L. Pre-eclampsia: An Excessive Maternal Inflammatory Response to Pregnancy. *Am J Obstet Gynecol* 180: 499, 1999.
24. Hall J.G. Genomic Imprinting: Nature and Clinical Relevance. *Annu Rev Med.* 48 (35-44): 35-44, 1997.
25. Moses E.K., Lade J.A., Guo G., Wilton A.N., Grehan M., Freed K., Borg A., Terwilliger J.D., North R., Cooper D.W and Brennecke S.P. A Genom Scan in Families from Australia and Zealand Confirms the Presence of A Maternal Susceptibility Locus for Pre-eclampsia, on Chromosome 2. *Am. J. Hum. Genet.* 67:1581-1585, 2000.
26. Lachmeijer A.M.A., Arngrimsson R., Bastiaans E.J., Frigge M.L., Pals G., Sigurdardottir S., Stefansson H., Palsson B., Nicolae D., Kong A., Aanoudse J.G., Gulcher J.R., Dekker G.A., Kate L.P ten. and Stefanson K. A Genome-Wide Scan For Pre-eclampsia in The Netherlands. *Europ. J. Of Human Genetics.* 9:758-764,2001.
27. Laivuori H., Lahermo P., Ollikainen V., Widen E., Mallinen L-H., Sundström H., Laitinen T., Kaaja R., Ylikorkala O. and Kere J. Susceptibility Loci for Preeclampsia on Chromosomes 2p25 and 9p13 in Finnish Families. *Am. J. Hum. Genet.* 72:168-177, 2003.
28. Doering T.P., Haller N.A., Montgomery M.A., Freeman E.J. and Hopkins M.P. The Role of AT₁ Angiotensinogen Receptor Activation in The Pathogenesis of Pre-eclampsia. *Am. J. Obstet Gynecol.* 178: 1307-1312, 1998.
29. Morgan T., Craven C., Ward K. Human Spiral Artery Renin-Angiotensin System. *Hypertension.* 32: 683-687, 1998.
30. Choi H., Kang J.Y., Yoon H.S., Han S.S., Whang C.S., Moon I.G., Shin H.H., Park J.B. Assosiation of Angiotensin-Converting Enzyme and Angiotensinogen Gene Polymorphisms with Pre-eclampsia. *J. Korean Med. Sci.* 19: 253-257, 2004.

31. Procopciuc L., Jebeleonu G.H., Surcel I., Puscas M. Angiotensinogen Gene M235T Variant and Pre-eclampsia in Romanian Pregnant Women. *J. Cell. Mol. Med.* 6 (3): 383-388, 2002.
32. Guanglon G., Jennifer A.L., Wilton A.N., Moses E.K., Grehan M., Qiu Y.H., Cooper D.W., Brennecke S.P. Genetic Susceptibility to Pre-eclampsia and Chromosome 7q36. *Hum. Genet.* 105:641-647, 1999.
33. Hingoran A.D. Endothelial Nitric Oxide Synthase Polymorphisms and Hypertension. *Curr Hypertens Rep.* 5 (1): 19-25, 2003.
34. Makino A., Nakanishi T., Sugiura-Ogasawara M., Ozaki Y., Suzumori N., Suzumori K. No Association of C677T Methylene tetrahydrofolate Reductase and Endothelial Nitric Oxide Synthase Polymorphism with Recurrent Pregnancy Loss. *A.J.R.I.* 52:60-66, 2004.
35. Bashford M.T., Hefler L.A., Vertrees T.W., Roa B.B., Gregg A.R., Angiotensinogen and endothelial Nitric Oxide Synthase Gene Polymorphisms Among Hispanic Patients with Pre-eclampsia. *Am. J. Obstet Gynecol.* 184(7):1345-1350, 2001
36. Hakli T., Romppanen E-L., Hiltunen M., Helisalme S., Punnonen K., Heinonen S. Endothelial Nitric Oxide Synthase Polymorphism in Pre-eclampsia. *J. Soc. Gynecol Investing.* 10 (3):154-157, 2003.
37. Laivuori H., Kaaja R., Ylikorkala O., Hiltunen T. And Kontula K. 677C→T Polymorphism of The Methylene tetrahydrofolate Reductase Gene and Pre-eclampsia. *The American College of Obstetricians and Gynecologists.* 96 (2): 277-280, 2000.
38. Sohda S., Arinami T., Hamada H., Yamada N., Hamaguchi H., Kubo T., Methylene tetrahydrofolate Reductase Polymorphism and Pre-eclampsia. *J. Med. Genet.* 34(6):525-526, 1997.
39. Pregoraro R.J., Chikosi A., Rom Lee., Roberts C., Moodley J. Methylene tetrahydrofolate Reductase Gene polymorphisms in Black South Africans and The Association with Pre-eclampsia. *Acta Obstet Gynecol scand.* 83:449-454, 2004.

40. Kaiser T., Brennecke S.P., Moses E.K. Methylenetetrahydrofolate Reductase Polymorphisms are Not A Risk Factor for Pre-eclampsia/Eclampsia in Australian Women. *Gyn. and Obst. Invest.* 50: 100-102, 2000.
41. Yılmaz H., Ünlüçerçi Y., Gürdöl F., Isbilen E., Isbır T. Association of Pre-eclampsia with Hyperhomocysteinemia and Methylenetetrahydrofolate Reductase Gene C677T Polymorphism in A Turkish Population. *Aust. and N.Z.J. of Obst. and Gyn.* 44: 423-427, 2004.
42. Bloomenthal D., Dadelszen P.V., Liston R., Magee L., Tsang P. The Effect of Factor V Leiden Carriage on Maternal and Fetal Health. *C.M.A.J.* 167 (1): 48-54, 2002.
43. Hashimoto K., Shizusawa Y., Shimaya K., Ohashi K., Shimizu T., Azuma C., Murata Y. The Factor V Leiden Mutation in Japanese Couples with Recurrent Spontaneous Abortion. *Hum. Rep.* 14 (7): 1872-1874, 1999.
44. Promusinto D., Sknablin S., Fimmers R., van der Ven K. Ethnic Differences in The Association of Factor V Leiden Mutation and The C677T Methylenetetrahydrofolate Reductase Gene Polymorphism with Pre-eclampsia. *Europ. J. of Obst. and Gyn. and Rep. Bio.* 112:162-169, 2004.
45. O'Shaughnessy K.M., Fu B., Ferraro F., Lewis I., Downing S., Morris N.H. Faktor V Leiden and Thermolabile Methylenetetrahydrofolate Reductase Gene Variants in an East Anglian Pre-eclampsia Cohort. *Hypertension.* 33 (6): 1338-1341, 1999.
46. Camileri R.S., Peebles D., Portmann C., Everington T., Cohen H. -455 G/A beta-Fibronogen Gene Polymorphism, faktor V Leiden, Prothrombin G20210A Mutation and MTHFR C677T and Placental vascular Complications. *Blood Coagul. Fibrinolysis.* 15 (2): 139-147, 2004.
47. Yamada N., Arinami T., Yamafawa-Kobayashi K., Watanabe H., Sohda S., Hamada H., Kubo T., Homoguchi H. The 4G/5G Polymorphism of The Plasminogen Activator Inhibitor-1 Gene is Assosiated with Severe Pre-eclampsia. *J. Hum. Genet.* 45 (3): 138-141, 2000.

48. Fabbro D., D'Elia A.V., Spizzo R., Driul L., Barillari G., Di Loreto C., Marchesoni D., Damante G. Association Between plasminogen Activator Inhibitor 1 Gene Polimorphisms and Pre-eclampsia. *Gynecol Obstet Invest.* 56 (1): 17-22, 2003.
49. Hakli T., Rompanen E.L., Hiltunen M., Helisalmi S., Punnonen K., Heinonen S. Plasminogen Activator Inhibitor-1 polymorphism in Women with Pre-eclampsia. *Genet. Test.* 7 (3): 265-268, 2003.
50. O'Shaughnessy K.M., Fu B., Downing S., Morris N.H. Thrombophilic Polymorphisms in Pre-eclampsia: Altered Frequency of the Function 98C>T Polymorphism of Glycoprotein IIIa. *J. Med. Genet.* 38: 775-777, 2001.
51. Pegoraro R.J., Hira B., Rom L., Moodley J. Plasminogen Activator Inhibitor Type 1 (PAI1) and Platelet Glycoprotein IIIa (PGIIIa) Polymorphisms in Black South Africans with Pre-eclampsia. *Acta Obstet Gynecol Scand.* 82: 313-317, 2003.
52. Hira B., Pegoraro R.J., Rom L., Moodley J. Absence of Factor V Leiden, Thrombomodulin and Prothrombin Gene Variants in Black South African Women with Pre-eclampsia and Eclampsia. *B. J. O. G.* 110 (3): 327-328, 2003.
53. Chikosi A.B., Moodley J., Pegoraro R.J., Lanning P.A., Rom L. Apolipoprotein E Polymorphism in South African Zulu Women with Pre-eclampsia. *J. Hum. Genet.* 45 (3): 138-141, 2000.
54. O'Brien M., Dausset J., Carosella E.D., Moreau P. Analysis of The Role of HLA-G in Pre-eclampsia. *Human Immunology.* 61: 1126-1131, 2000.
55. Bermingham J., Jenkins D., McCarthy T., O'Brien M. Genetic Analysis of Growth factorII and HLA-G in Pre-eclampsia. *Biocheical Society Transactions.* 28 (2): 215-219, 2000.
56. Kilpatrick D.C. Influence of Human Leukocyte Antigen Tumour Necrosis Factor Genes on The Development of Pre-eclampsia. *Europ. Soc. of Hum. Rep. and Emb.* 5 (2): 94-102, 1999.

57. Lachmeijer A.M.A., Crusius B.A., Pals G., Dekker G.A., Arngrimsson R., tenKate L.P. Polymorphism in The Tumor Necrosis factor and Lymphotoxin- α Gene Region and Pre-eclampsia. *ACOG*. 98 (4): 612-619, 2001.
58. Heiskonen J., Roppanen R-L., Hiltunen M., Livonen S., Mannermaa A., Punnonen K., Heinonen S. Polymorphism in The Tumour Necrosis Factor- α Gene in Women with Pre-eclampsia. *J. Assist. Reprod. Genet.* 19: 220-223, 2002.
59. Kaiser T., Gerhan M., Brennecke S.P., Moses E.K. Assosiation of The TNF2 Allel with Eclampsia. *Gyn. and Obst. Invest.* 57 (4): 204-209, 2004.
60. Hefler L.A., Tempfer C.B., Gregg A.R. Polymorphisms Within The Interleukin-1 β gene Cluster and Pre-eclampsia. *ACOG*. 97: 664-668, 2001.
61. Hubel C.A., Roberts J.M., Ferrell R.E. Assosiation of Pre-eclampsia with Common Coding Sequense Variations in The Lipoprotein Lipase Gene. *Clin. Genet.* 56: 289-296, 1999.
62. Kim Y.J., Williamson R.A., Chen K., Smith J.L., Murray J.C., Merrill D.C. Lipoprotein Lipase gene Mutations and The Genetic Susceptibility of Pre-eclampsia. *Hypertension* 38: 992-996, 2001.
63. Ioannides C. In: *Drugs, Diet and Diseases, Mechanistic Approaches to Cancer*. Volume 1: 229-258, 1995.
64. McCarver D.G., Hines R.N. The Ontogeny of Human Drug-Metabolizing Enzymes: Phase II Conjugation Enzymes and Regulatory Mechanisms. *The American Society for Pharmacology and Experimental Therapeutics*. 300 (2): 361-366, 2002.
65. Phillips I.R, Shephard E.A., Povey S., Davis M.B., Kelsey G., Monteiro M., West L.F., Cowel J. A Cytochrome P450 Gene Family Mapped to Human Chromosome 19. *Ann. Hum. Genet.* 49 (4): 267-74, 1985.
66. Davis M.B., West L.F., Shephard E.A., Phillips I.R. Regional Localization of A Human Cytochrome P450 (CYP 1) to Chromosome 19q13.1-13.3. *Ann. Hum. Genet.* 50 (3): 237-40, 1986.

67. Çelik K, Armutcu F, Aker A. Human Placental Glutathione-S-Transferase: Isolation, Kinetic Properties and in vitro Interactions with Several Dugs. C.Ü.Tıp Fakültesi dergisi. 25(4):187-192, 20003.
68. Hirvmen A. Polymorphisms of Xenobiotic-Metabolizing Enymes and Susceptibility yo Cancer. Enviromental Healty Perspective. 107 (1): 37-46, 1999.
69. Standberg M., Hassett C., Adman E.T., Meijer J., Omiecinski C.J. Identification and Functional Characterization of Soluble Epoxide Hydrolase Genetic Polymorphisms. The Journal of Biological Chemistry. 275 (37): 28873-28881, 2000.
70. Murray K. R., Harper'ın Biyokimyası. Zenobiyotiklerin Metabolizması. ISBN:975-95331-1-1, 799-806, 1996.
71. Raaka S, Haset C, Omiecinski C.J. Human Microsomal Epoxide Hydrolase: 5'-Flanking Region Genetic Polymorphisms. Carcinogenesis. 19 (3): 387-393, 1998.
72. Shiseki K., Itoda M., Saito Y., Nakajima Y., Maekawa K., Kimura H., Goto Y., Saitoh O., Katoh M., Ohnuma T., Kawai M., Sugai K., Ohtsuki T., Suzuki C., Minami N., Ozawa S., Sawada J. Five Novel Single Nucleotide Polymorphism in The MEH1 Gene Encoding Microsomal Epoxide Hydrolase. Drug Metab. Pharmacokin. 18(2): SNP10 (150)-SNP13 (153), 2003.
73. Lancaster J.M., Brownlee H.A., Bell D.A., Futreal P.A., Marks J.R., Berchuck A., Wiseman R.W., Taylor J.A. Microsomal Epoxide hydrolase Polymorphism as a Risk Factor for Ovarian Cancer. Molecular Carcinogenesis. 17:160-162, 1996.
74. Baxter S.W., Choong D.Y.H., Compbell I.G. Microsomal Epoxide Hydrolase Polymorphism and Susceptibility to Ovarian Cancer. Cancer Letter. 117: 75-81, 2002.
75. Spurdle M.B., Purdie D.M., Webb P.M., Chen X., Gren A., Chenevix-Trench G. The Microsomal Epoxide Hydrolase Tyr113→His

- Polymorphism: Association with Risk of Ovarian Cancer. *Molecular Carcinogenesis*. 30: 71-78, 2001.
76. Smith C.A.D., Harrison D.J. Association Between polymorphism in Gene for Microsomal Epoxide Hydrolase and Susceptibility to Emphysema. *Lancet*. 350: 630-633, 1997.
 77. Takeyabu K., Yamaguchi E., Suzuki I., Nishimura M., Hizawa N., Kamakami Y. Gene Polymorphism for Microsomal Epoxide hydrolase and Susceptibility to Emphysema in A Japanese Population. *Eur. Respir. J.* 15: 891-894, 2000.
 78. Budhi A., Hiyama K., Isobe T, Oshima Y., Hara H., Maeda H., Kohro N. Genetic Susceptibility for Emphysematous Changes of The Lung in Japanese. *International Journal of Molecular Medicine*. 11: 321-329, 2003.
 79. Yim J.J., Park G.Y., Lee C-T., Kim Y.W., Han S.K., Shim Y-S., Yoo C-G. Genetic Susceptibility to Chronic Obstructive Pulmonary Disease in Koreans: Combined Ananalysis of Polymorphic Genotypes for Microsomal Epoxide Hydrolase and Glutathione S-Transferase M1 and T1. *Thorax*. 55: 121-125, 2000.
 80. Cheng S-L., Yu C-J., Chen C-J., Yang P-C. Genetic Polymorphism of Epoxide Hydrolase and Glutathione S-Transferase in COPD. *Eur. Respir. J.* 23: 818-824, 2004.
 81. Abdell-Rahman Ş.Z., Ammenheuser M.M., Ward J.B. Human Sensitivity to 1,3-Butadiene: Microsomal Epoxide Hydrolase Polymorphisms. *Carcinogenesis*. 22(3): 415-423, 2001.
 82. McHale C.M., Yin S, Wienke J.K., O'Neill J.P., Rothman N., Li G-L., Smith M.T. Lack of Increased Genetic Damage in 1,3-Butadiene-Exposed Chine Workers Studied in Relation to MEH1 and GST Genotypes. *Mutation Research*. 558: 63-74, 2004.
 83. London S.J., Smart J., Daly A.K. Lung cancer Risk in Relation to genetic Polymorphism of Microsomal Epoxide Hydrolase Among African-Americans and caucasians in Los Angeles County. *Lung Cancer*. 28: 147-155, 2000.

84. Zhou W., Thurston S.W., Liu G., Xu L.L., Miller D.P., Wain J.C., Lynch T.J., Su L., Christiani D.C. The Interaction Between Microsomal Epoxide Hydrolase Polymorphisms and Cumulative Cigarette Smoking in Different Histological Subtypes of Cancer. *Cancer Epidemiology, Biomarkers & Prevention*. 10:461-466, 2001.
85. Zhou W., Thurston S.W., Liu G., Xu L.L., Miller D.P., Wain J.C., Lynch T.J., Su L., Christiani D.C. Genetic Polymorphism in N-acetyltransferase-2 and Microsomal Epoxide Hydrolase, Cumulative Cigarette Smoking and Cancer. *Cancer Epidemiology, Biomarker & Prevention*. 11: 15-21, 2002.
86. Lin P., Wang S-L., Chen K-W., Lee H-S., Tsai K-J., Chen C-Y, Lee H. Association of CYP1A1 and Microsomal Epoxide Hydrolase Polymorphisms with Lung Squamous Cell Carcinoma. *British Journal of Cancer*. 82 (4): 852-857, 2000.
87. Cortessis V., Siegmund K., Chen Q., Zhou N., Diep A., Frankl H., Lee E., Zhu Q-S., Haile R., Levy D. A Case-Control Study of Microsomal Epoxide Hydrolase, smoking, Meat Consumption, Glutathione S-Transferase M3, and Risk of Colorectal Adenomas. *Cancer Research*. 61: 2381-2385, 2001.
88. Jourenkova-Mironova N., Mitrunen K., Bouchardy C., Dayer P., Simone B., Hirvonen A. High-activity Microsomal Epoxide Hydrolase Genotypes and The Risk of Oral, Pharynx and Larynx Cancers. *Cancer Research*. 60: 534-536, 2000.
89. Soucek P., Sarmanova J., Kristensen V.N., Apitauerova M., Gut I. Genetic Polymorphisms of Biotransformation Enzymes in Patients with Hodgkin's and non-Hodgkin's Lymphomas. *Int.Arch. Occup. Environ. Health*. 75: 586-592, 2002.
90. Sarmanova J., Benesova K., Gut I., Nedelcheva-Kristensen V., Tynkova L., Soucek P. Genetic Polymorphisms of Biotransformation Enzymes in Patients with Hodgkin's and non-Hodgkin's Lymphomas. *Human Molecular Genetics*: 10 (12): 1265-1273, 2001.
91. Tiemersma E.W., Omer R.E., Bunschoten A., van't Veer P., Kok F.J., Idris M.O., Kadaru M.Y., Fedail S.S., Kampman E. Role of Polimorphism of Glutathione-S-Transferase T1and Microsomal Epoxide Hydrolase in

- Aflatoxin-associated Hepatocellular carcinoma. *Cancer Epidemiology, Biomarkers & Prevention*. 10:785-791, 2001.
92. de Assis S., Ambrosone C.B., Wustrack S., Krishnon S., Freudenheim J.L., Shields P.G. Microsomal Epoxide Hydrolase Variants Are Not Associated with Risk of Breast Cancer. *Cancer Epidemiology, Biomarkers & Prevention*. 11: 1697-1698, 2002.
 93. Wilson M.H., Grant P.J., Hardie L.J., Wild C.P. Glutathione S-Transferase M1 Null Genotype is Associated with A Decreased Risk of Myocardial Infarction. *FASEB. J.* 14: 791-796, 2000.
 94. Zhu Q-S., Xing W., Qian B., Dippe P.V., Shneider B.L., Fox V.I., Levy D. Inhibition of Human m-Epoxide Hydrolase gene Expression in A Case of Hypercholonemia. *BBA J.* 1638: 208-216, 2003.
 95. Lüleci G., Sakızlı M., Alper Ö., Renkli Genetik Atlası ISBN: 975-420-035-1, 1995.
 96. Powledge T.M. The polymerase Chain Reaction. *Adv. Physiol. Educ.* 28: 44-50, 2004.
 97. Başbüyük H.H., Bardakçı F., Belshaw R., Quicke D.L.J. *Phylogenetic Systematics: A Practical Guide to Theory and Practice*. Önder matbaa, Sivas/Turkey, 2000.
 98. Klug W.S., Cummings M.R. (Çeviri editörü: Öner C.) *Genetik Kavramlar*. Palme yayıncılık Altıncı baskı, ISBN: 0-13-081626-4, Sayfa: 515-17, 2003.
 99. Miller S.A., Dykes D.D., Poldesky H.F., A Simple Salting-Out Procedure for Extracting DNA from Human Nucleated Cell. *Nucl. Acids Res.* 16, 1215, 1988.
 100. Sümbüloğlu K., *Sağlık Bilimlerinde Araştırma Teknikleri ve İstatistik*, Matis Yayınları, Ankara, 1978.
 101. Zar J.H. *Biostatistical Analysis*. Fourth Edition. ISBN:013081542X, Sayfa: 489, 1998.
 102. Al-Muhim A., Abu-Heijja A., Al-Yamma F., El-Harith E.A. Pre-eclampsia: Maternal Risk Factors and Perinatal Outcome. *Fetal Diagnosis and Therapy*. 18:275-280, 2003.

103. Brajenari-Mili B., Tislri D., Uvi-Butorae M., Ba J, Petrovi O., Risli S., Mimica M., Kapavi M. Elevated Second-Threemestit Free -hCG as An Isolated Finding and Pregnancy Outcomes. *Fetal Diagnosis and Therapy*. 19(6):483-497, 2004.
104. Şahin H.G., Şahin H.A., Şahin I., Onbaşı K. Risk Factors for The High Prevalence of HELLP Syndrome and The Outcome. Index. University of yuzuncu Yıl Medical Faculty, Van/Turkey, 1997-2000.
105. Pıpkın F.B., Phil D. Risk Factors for Pre-eclampsia. *N Engl Med*. 344(12): 925-26, 2001.
106. Qiu C., Williams M.A., Leisenring W.M., Sorensen T.K., Frederick I.O., Dempsey J.C., Luthy D.A. Family History of Hypertension and Type 2 Diabetes in Relation top Pre-eclampsia Risk. *Hypertension*. 41: 408-413, 2003.
107. Bryson C.L., Ioanou G.N., Rulyak S.J., Critchlow C. Association Between Gestational Diabetes and Pregnancy-Induced Hypertension. *Am. J. Epidemiol*. 158: 1148-1153, 2003.
108. Sibai B.M., Ewell M., Levine R.J., Klebaneff M.A., Esterlitz J., Catalana P.M., Goldenberg R.L., Joffe G. Risk factors Associated with Pre-eclampsia in healthy Nulliparous Women. The Calcium for Pre-eclampsia Prevention (CPEP) Study Group. *Am. J. Obstet Gynecol*. 177 (5): 1003-10, 1997.
109. Daawson L.M., Parfrey P.S., Hefferton D., Dicks E.L., Cooper M.J., Young D., Marsden P.A. Familial Risk of Pre-eclampsia in Newfoundland: A Population-Based Study. *J. Am. Soc. Nephrol*. 13: 1901-1906, 2002.
110. Esplin M.S., Fausett B., Fraser A., Kerber R., Mineau G., Carrillo J., Varner M.W. Paternal and Maternal Component of the Predisposition to Pre-eclampsia. *N. Engl. J. Med*. 344 (12): 867-872, 2001.
111. Chesley L.C., Cooper D.W. Genetics of Hypertension in Pregnancy: Possible Single Gene Control of Pre-eclampsia in The Descendants of Eclamptic Women. *Br. J. Obstet Gynaecol*. 93 (9): 898-908, 1989.

EK - 1**KONTROL GRUBU**

Çalışmaya Alınacak Bireylerin Özellikleri;

1. Yaş 18-35 arasında olacak,
2. Sigara içmeyecek,
3. En az iki canlı doğum yapmış olacak,
4. Spontan abortus öyküsü olmayacak, istemli D/C alınabilir,
5. Kendisi ve ailesinde (anne, teyze, kız kardeş) pre-eklampsi, eklampsi ve HELLP sendromu öyküsü olmayacak,
6. Hipertansiyon, Diyabetes Mellitus (DM), vasküler hastalık ve otoimmün hastalık olmayacak.

Adı Soyadı:

Yaşı:

Gebelik sayısı:

Doğum sayısı:

Yaşayan çocuk sayısı:

Abortus sayısı:

Küretaj sayısı:

Çalışmaya katılmayı kabul ediyorum.

İMZA

EK – 2**PRE-EKLAMPSİ, EKLAMPSİ VE HELLP SENDROMU HASTA GRUBU**

Çalışmaya Alınacak Hastalarda Uygulanan Anket;

Adı Soyadı:

Telefon no:

Protokol no:

Yaş:

Gebelik sayısı:	Doğum Sayısı:	Yaşayan Çocuk Sayısı:	Abortus Sayısı:
Diyabet öyküsü:		Var	Yok
Sigara kullanımı:		İçiyor	İçmiyor
Hastanın eşi ile akrabalığı:		Var	Yok
Hastanın annesi ile babası arasında akrabalık:		Var	Yok
Hastanın ailesinde pre-eklampsi nedeniyle maternal mortalite:		Var	Yok
Önceki gebelikte pre-eklampsi:		Var	Yok
Ailede pre-eklampsi öyküsü:		Kız kardeş	Anne
Teyze			
Sosyo-ekonomik düzey:		Düşük	Orta
Yüksek	Organ tutulumu:	Beyin	Böbrek
Pulmoner ödem	Göz		
Tanı:	Pre-eklampsi	Eklampsi	HELLP sendromu
Gebelik Haftası:			
Diastoloik kan basıncı:			

Çalışmaya katılmayı kabul ediyorum.

İMZA

EK - 3

Genomik DNA Eldesinde Kullanılan Solüsyonların Hazırlanması

- Nüklei Lysis Tamponu: 10mM Tris-HCl 1.576g, 400mM NaCl 23.4g ve 2mM Na₂EDTA 0.7g 1000ml bidistile su içerisinde çözdürülerek pH: 8.2'ye ayarlandı. Otoklavda steril edilerek +4°C' de saklandı.
- Sodyum Dodesil Sülfat (SDS): 10g SDS 100ml bidistile suda çözdürülerek %10'luk solüsyon hazırlandı. Sterilizasyon işlemi filtreden geçirilerek yapıldı.
- Proteinaz K Dilüsyon Tamponu: Sıvı olarak 20mg/ml hazırlanmış solüsyonu kullanıldı.
- TE Tamponu (Tris-HCl, EDTA): 10 mM Tris-HCl 0.394g, 1mM Na₂EDTA 0.093g 250ml bidistile suda çözdürülerek otoklavda steril edildi.
- Amonyum Asetat
10M 148g amonyum asetat 200ml bidistile su içinde çözdürülerek hazırlandı. Bu solüsyonun steril edilmesine gerek yoktur.

Yükleme Tamponunun (Loadind Dye) Hazırlanması

- Formamid (%95) 9.5 ml
- Xylen Cyanol (%0.5) 0.05 gr
- Bromfenol Blue (%0.5) 0.05 gr

Bu üç kimyasal 15 ml'lik konik santrifüj tüpü içerisine konularak vortekste karıştırıldı. Kullanılmak üzere +4 °C' de saklandı.

PCR Çalışma Solüsyonlarının Hazırlanması

- dNTP solüsyonu: 100mM stok Adenin, Timin, Guanin, Sitozin nükleotitlerinin her birinden 2µl alınarak 92µl distile su ile karıştırıldı. 2 mM'lık dNTP çalışma solüsyonu hazırlandı.

- Forward primer: 75 pmol'lük stoktan çalışma solüsyonu konsantrasyonu 100µl 10pmol olacak şekilde 86.5µl distile suya 13.5µl ekson-4 forward primeri eklenerek hazırlandı.
- Reverse primeri: 119pmol'lük stoktan çalışma solüsyonu konsantrasyonu 100µl 10pmol olacak şekilde 91.5 µl distile suya 8.5µl ekson-4 reverse primeri eklenerek hazırlandı.



T.C.
CUMHURİYET ÜNİVERSİTESİ
TIP FAKÜLTESİ
ETİK KURUL BAŞKANLIĞI

SAYI : B.30.2.CUM.0.1H.00.00/10
KONU :

18/06/2002

Karar No: 10

Etik Kurul Kararları :

11- "Preeklampsi, Eklampsi ve HELLP sendromu Riski ile Glutatyon S-Transferaz M1, Glutatyon S-Transferaz T1 ve Mikrozomal Epoksit Hidrolaz Genleri Polimorfizmi" adlı Dr.Meral ÇETİN'e ait ferdi araştırması, yerel etik kurul kararında uygun olduğuna;

Karar verilmiştir.

Prof.Dr.Füsün GÜLTEKİN

Prof.Dr.Fahrettin GÖZE

Doç.Dr.Tijen KAYA

Doç.Dr.Okay BULUT

Prof.Dr.Suat TOPAKTAŞ
(Katılmadı)

Prof.Dr.Öge ÇETİNKAYA
(İzinli)

Doç.Dr.Serdar SOYDAN